



Interactions olfacto-alimentaires : étude fonctionnelle de la plasticité du système olfactif chez deux modèles murins de l'obésité

Yan Chelminski

► To cite this version:

Yan Chelminski. Interactions olfacto-alimentaires : étude fonctionnelle de la plasticité du système olfactif chez deux modèles murins de l'obésité. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Paris Saclay (COmUE), 2015. Français. NNT : 2015SACLS129 . tel-01279922

HAL Id: tel-01279922

<https://theses.hal.science/tel-01279922>

Submitted on 28 Feb 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

NNT : 2015SACLS129

THESE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY,
PREPAREE A
L'UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE N°568 BIOSIGNE

Signalisations et réseaux intégratifs en Biologie

Spécialité de doctorat : Sciences de la vie et de la santé

Par

M. Yan Chelminski

Interactions olfacto-alimentaires: étude fonctionnelle de la plasticité du système olfactif chez deux modèles murins de l'obésité.

Thèse présentée et soutenue à Orsay, le 27 novembre 2015 :

Composition du Jury :

Mme. S. Granon, Professeure, Université Paris-Sud, Présidente du Jury
Mme. AM. Mouly, Chargée de Recherche, CNRS, Rapporteur
M. JM. Bonny, Directeur de Recherche, INRA, Rapporteur
Mme S. Migrenne, Maître de Conférences, Paris-Diderot, Examinatrice
M. P. Congar, Chargé de Recherche, INRA, Examineur
M. H. Gurden, Directeur de Recherche, CNRS, Directeur de thèse



Table des matières

Abréviations	8
Résumé de la thèse	10
Préambule : sens chimiques et alimentation	12
Chapitre I : Organisation anatomique et fonctionnelle du système olfactif	14
1. Le stimulus olfactif	16
2. La muqueuse olfactive.....	19
2.1 Anatomie et organisation cellulaire.....	19
2.2 Fonctions des OSN et de leurs récepteurs	23
3. Le bulbe olfactif principal	27
3.1. Anatomie et organisation cellulaire.....	28
3.2. Fonctions du BO : un carrefour olfactif et métabolique	35
3.3. Le codage temporel dans le BO	53
3. Sortie de l'information du BO vers le PC	67
Conclusion du chapitre I	68
Chapitre II : Métabolisme énergétique, prise alimentaire et obésité	69
1. Régulation centrale de la prise alimentaire	71
1.1. L'hypothalamus	72
1.2. Le tronc cérébral.....	75
1.3. Autres structures du système limbique	76
2. Signaux périphériques de régulation de la prise alimentaire	77
2.1. Les nutriments	77
2.2. Signalisation par le glucose et les acides gras	79
2.3. Signalisation par les molécules orexigènes.....	79
2.4. Signalisation par les molécules anorexigènes.....	81
3. L'obésité	84
3.1 Les modèles de l'obésité chez les rongeurs	86
3.2 L'impact de l'obésité sur l'homéostasie énergétique	88
Chapitre III : Interactions olfacto-alimentaires et problématique de la thèse	90

1. Données sur les systèmes orexigènes et anorexigènes dans le système olfactif : synthèse locale et localisation des récepteurs	92
1.1. Systèmes orexigènes	92
1.2. Systèmes anorexigènes	93
2. Interactions olfacto-alimentaires : études fonctionnelles	96
2.1. Interactions entre état nutritionnel et perception olfactive : études comportementales.....	96
2.2. Etudes moléculaires, cellulaires et fonctionnelles par électrophysiologie et imagerie	98
3. Nouveaux candidats pour la modulation de l'activité olfactive : GLP-1 et PK2	101
4. Problématique de la thèse : étude de la plasticité spatiotemporelle des représentations sensorielles dans le BO chez les souris ob/ob déficientes en leptine	102
Partie 2 : Méthodes expérimentales	105
1. Animaux, hébergement et alimentation	106
2. Phénotype général des souris obèses	109
2.1. Pesées.....	109
2.2 Glycémie.....	109
2.3. Locomotion.....	110
2.4. Analyse statistique	110
3. Odeur alimentaire et odeur neutre utilisées pour le MEMRI	111
3.1. Fabrication de l'odeur alimentaire et choix de l'odeur neutre	111
3.2. Tests comportementaux d'exploration olfactive spontanées (non opérants)	111
3.3. Analyse statistique pour le comportement olfactif spontané	114
4. Conditions expérimentales de l'imagerie MEMRI	114
4.1. Injection de manganèse, stimulation olfactive et enregistrement IRM	114
4.2. Protocole d'acquisition MEMRI	114
4.3. Analyse manuelle des images MEMRI	115
4.4. Analyse des signaux MEMRI par Statistical Parametric Mapping (SPM)	116
4.5. Marquage anatomofonctionnel complémentaire du signal MEMRI.....	118
5. Injection de leptine.....	119
6. Conditions expérimentales de l'Imagerie Optique du Signal Intrinsèque.....	119
6.1. Anesthésie des souris témoins et ob/ob	119
6.2. Chirurgie	120
6.3. Odeurs	121
6.4. Stimulation olfactive.....	121
6.5. Acquisition des images	121

6.6. Microscope	122
6.7. Source lumineuse	122
6.8. Camera	122
6.9. Logiciel d'acquisition	123
7. Electrophysiologie chez la souris éveillée	124
7.1. Implantation des électrodes d'enregistrement à demeure	124
7.2. Dispositif d'électrophysiologie	125
7.3. Analyse des signaux LFP	126
8. Test comportemental de discrimination olfactive (Go / No Go)	127
9. Neurogenèse	130
9.1. Injections des marqueurs de la division cellulaire	130
9.2. Analyse des tissus	130
9.3. Protocole d'analyse et de comptage des cellules	131
10. Quantification des marqueurs moléculaires pour estimer l'inflammation intrabulbaire chez les souris obèses	132
Partie 3 : Résultats	134
1. Phénotype et physiologie des souris obèses	135
1.1. Souris déficientes en leptine depuis la naissance, souris ob/ob	135
1.2. Physiologie des souris rendues obèses par alimentation hypercalorique -hyperlipidique (Diet-Induced Obesity)	137
2. Activité locomotrice	139
3. Imagerie Optique des Signaux Intrinsèques	140
4. Tests comportementaux d'exploration olfactive spontanée	141
4.1 Exploration de la pâte odorisée versus la pâte non odorisée.	145
4.2 Exploration de l'odeur d'amande, de l'odeur d'orange et de l'odeur de pentylacétate	142
5. IRM renforcée au contraste de manganèse	148
5.1 Analyse manuelle de l'intensité brute des pixels	148
5.2. Comparaison d'images MEMRI analysées par SPM	152
6. Neurogenèse	166
7. RtPCR	168
8. Test de discrimination olfactive et enregistrement des réponses électrophysiologiques en LFP.	168
8.1 Courbes d'apprentissage illustrant la progression des animaux au cours de la tâche Go/NoGo pour trois groupes expérimentaux différents	170

8.2 Description des différentes étapes d'apprentissage au cours de la tâche de discrimination olfactive Go/NoGo.....	173
8.3 Analyse des réponses oscillatoires enregistrées au cours de la tâche de discrimination olfactive Go/NoGo.....	175
9. Résumé des résultats	181
Partie 4 : Discussion	183
1. Choix des modèles et des techniques d'étude des interactions olfacto-alimentaires	184
1.1 Modèles murins.....	184
1.2. Choix de l'anesthésie et de la technique d'imagerie neurofonctionnelle.....	186
1.3. Injection de la leptine	188
2. Variations du comportement d'exploration en fonction de l'état métabolique, de l'état nutritionnel et de l'odeur présentée	188
3. Implication de la leptine dans la distribution spatiale de l'activité dans le BO	190
4. Plasticité de la représentation temporelle des odeurs chez les souris obèses suite à un apprentissage	194
5. Leptine, obésité et régulation de mécanismes olfactifs	195
Conclusion	199
Bibliographie	200
Index des figures	226
Liste des présentations orales et affichées pendant la thèse	229

Remerciements

En écrivant ces lignes, je suis en mesure d'affirmer que la traversée d'une thèse représente une tempête émotionnelle et intellectuelle intense. Tantôt porté par un enthousiasme débordant et une inspiration inépuisable, tantôt précipité vers un désespoir insondable, je n'aurai jamais pu terminer cette thèse sans l'aide et la collaboration des personnes qui m'ont aidé à garder la tête froide, ou à simplement la relever et maintenir le cap. Je souhaiterais les remercier ici, quelle que soit l'importance de leur contribution à ma thèse.

En premier lieu, Hirac Gurden, pour m'avoir permis de partager ta vision de la recherche scientifique, toujours précise et méticuleuse, mais avant tout pleine de bon sens. Malgré les périodes difficiles que j'ai pu traverser, tu t'es adapté à mon caractère, et plus que tout, tu m'as fait confiance jusqu'au bout. Tu m'as appris à encaisser et prendre du recul par rapport à mes erreurs, et en extraire la substantifique moelle pour m'améliorer à la fois en théorie et en pratique. Enfin, ta capacité à ne jamais rien tenir pour acquis et souvent remettre les choses en question, y compris ton propre avis, ont constitué des échanges passionnants.

Claire Martin, pour m'avoir transmis ton savoir-faire, ta bonne humeur et ton enthousiasme jamais fléchissant, malgré de longues séances de comportement pendant lesquelles les souris n'étaient pas toujours coopératives ! J'ai également toujours été impressionné par ta clairvoyance, presque surnaturelle, concernant l'origine des problèmes rencontrés en manip. Enfin, merci d'avoir répondu à tout et de ne jamais avoir rechigné à me donner un coup de main (et même deux) quand j'en avais besoin.

Catherine Sebré, pour tes intuitions scientifiques et humaines toujours juste. Tu as été d'une aide inestimable, à la fois pour les manips et pour tes conseils techniques, mais aussi pour simplement se marrer un bon coup devant un café les matins difficiles, et pour l'aide que tu as pu apporter spontanément à mes proches. Bref, merci pour cette collaboration enrichissante à tous les points de vue.

Albertine Dubois, pour avoir joué le rôle de la cavalerie (sans chevaux mais avec le panache et le bon timing) et m'avoir aidé à débloquer une situation qui me paraissait inextricable. Merci également d'avoir fourni tous ces efforts pour non seulement m'avoir aidé à peaufiner au maximum mes images, mais également pour m'avoir expliqué de façon claire et didactique des aspects techniques peu évidents, le tout dans la bonne humeur !

Sophie Scotto-Lomassese, pour avoir apporté son expertise et son savoir-faire concernant la neurogénèse et les échanges intéressants que nous avons eu à ce sujet.

Je tiens également à exprimer mes sincères remerciements aux autres membres ou ex-membres du laboratoire IMNC :

Frédéric Pain, pour la qualité de ses remarques scientifiques et son aide précieuse lors des manips d'imagerie, sa capacité à s'adapter à n'importe quel auditoire et jongler entre des disciplines divers, et enfin d'être au coude à coude avec Olivier pour la palme du blagueur le plus rapide de l'Ouest !

Gaël Latour, que je pense ne jamais avoir vu de mauvaise humeur, pour son état d'esprit toujours rafraîchissant, et pour les quelques bières partagées avec plaisir de façon improbable à New York !

Olivier Seksek, le parrain, que je remercie d'avoir pris son rôle à cœur et m'avoir fournis de très bons conseils pendant ma thèse. Comme je l'ai mentionné plus tôt, merci également pour les blagues qui

ont fusé sans arrêt durant mon séjour au laboratoire, entraînant rire et désarroi (parfois en même temps).

Marc-Antoine Verdier, pour m'avoir permis de mettre de côté la science de temps à autre en discutant de nos passions communes, et pour avoir réveillé chez moi le démon du jeu (mon banquier ne te remercie pas, lui).

Alexandre Liège, pour avoir toujours su démêler les caprices informatiques de façon diablement efficace, le tout sans rester sérieux plus de 10 secondes consécutives.

Je voudrais également remercier Nathalie Arlaud, qui a toujours été là pour me fournir des conseils pertinents, qu'ils soient administratifs, professionnels ou personnels, le tout sans oublier de toujours faire preuve d'une extrême gentillesse. Merci également d'avoir participé à mon aventure féline et d'avoir appris à aimer ces bestioles !

Christiane Robin, qui était toujours présente pour m'apporter un coup de pouce administratif ou logistique, et qui à ce propos doit être un peu magicienne.

Enfin, je tiens à remercier l'ensemble des étudiants, stagiaires et doctorants, et des post doctorants qui ont participé à rendre l'atmosphère du laboratoire vivante et chaleureuse, que ce soit pendant les expéditions au CESFO, les pauses cafés, les différents pots... Ils sont trop nombreux pour que je les cite tous ici, mais je tiens en particulier à remercier Romain Chéry, qui a toujours été présent pendant mon M2, que ce soit en tant que compagnon de pause-café, le temps de discussions délirantes et salvatrices, ou en tant que mentor scientifique, toujours prêt à discuter de mes résultats, et surtout à m'initier à la chirurgie chez le petit animal. Ton savoir faire a été précieux, et durant l'ensemble de ma thèse j'ai eu l'impression d'entendre tes conseils méticuleux et sentir ton œil inquisiteur ! Enfin, je tiens à remercier Florian Ocelli et Amandine Gnaedinger, véritables compagnons de galère, toujours là pour partager nos mésaventures de doctorants, pour se détendre lors de discussions sans queue ni tête, échanger des opinions techniques ou scientifiques, se soutenir en cas de coups dur et j'en passe.

Merci à l'ensemble du laboratoire IMNC, vous avez tous contribué à faire du laboratoire un endroit chaleureux, et vos encouragements lors des périodes difficiles me sont allés droit au cœur

Je tiens aussi à remercier mes amis et ma famille, non pas individuellement, puisque je n'aurais pas la place de dire à quel point vous avez été importants pour moi, et que cela n'aurait guère de sens ici. Mais merci de vous être adaptés, et d'avoir été compréhensifs malgré mes absences et mon mutisme fréquent.

Pour terminer, je tiens à remercier Rose, qui malgré ses probres batailles, m'a toujours soutenu tout au long de ma thèse, quel que soit mon état d'esprit et mon humeur. Sans toi, je ne serai jamais arrivé jusqu'ici.

Abréviations

2-AG : Arachidonoylglycerol

2DG : Glucose radio-marqué 14C-2-DéoxyGlucose

AA : Acides Aminés

AEA : anandamide

AG : Acides Gras

AgRP : Agouti-Related Peptide

Am : Amygdale

AOB : Bulbe Olfactif Accessoire

AON : Noyau Olfactif Antérieur

ARC : Noyau Arqué de l'hypothalamus

AVC : Accident Vasculaire Cérébral

BDNF : Brain-Derived Neurotrophic Factor

BO : Bulbe olfactif

BOLD-fMRI : IRM fonctionnelle dépendante du niveau d'oxygénation vasculaire

CART : Cocaine-and-Amphetamine-Regulated-Transcript

CB : Récepteurs Cannabinoïdes

CCK : Cholécystokinine

CRH: Corticotrophin releasing hormone

DIO: Diet-Induced Obesity

DMN : Noyau Dorsomédial de l'hypothalamus

ECB : Endocannabinoïdes

EcoG : Electrocorticogramme

EEG : Electroencéphalogramme

EPL : Couche Plexiforme Externe

EPSP : Potentiel Post-Synaptique Excitateur

ETC : Cellules à Panache

FOV : Champ de Vue

GC : Cellules Granulaires

GCL : Couche des Cellules Granulaires

GL : Couche glomérulaire

GLP-1 : Glucagon-Like Peptide 1

HFD: High-Fat Diet

IA : Courants Transitoires

IOSI : Imagerie Optique du Signal Intrinsèque

IPL : Couche Plexiforme Interne

IR: Récepteurs à l'Insuline

IRM : Imagerie par résonance magnétique

IRS-1 : Insuline Receptor substrate1

JC : Cellules Juxtaglomérulaires

LFP : Potentiel de champ local

LHA : Aire Hypothalamique latérale

LOT : Tractus Olfactif Latéral

MC : Cellules Mitrales

MCH : Melanin Concentrating Hormone

MCL : Couche des Cellules Mitrales

MEMRI : Imagerie par résonance magnétique renforcée au manganèse

Mn2+ : Manganèse

MO : Muqueuse Olfactive

NACC : Noyau Accumbens

NPY : Neuropeptide Y

NTS : Noyau du Tractus Solitaire

OBP : Odorant Binding Protein

OE : Epithélium Olfactif

OFC : Cortex Orbitofrontal

OMP : Olfactory Marker Protein

ONL : Couche des Nerfs Olfactifs

OSN : Neurones Sensoriels Olfactifs

PA : Potentiel d'action

PBS : Phosphate-Buffered Saline

PC : Cortex piriforme

PET : Topographie par Emission de Positons

PG : Cellules périglomérulaires

PK2 : Prokinéticine 2

POMC : Propiomélanocortine

PVN : Noyau Paraventriculaire de l'hypothalamus

RO : Récepteurs Olfactifs

ROI : Région d'Intérêt

SAC : Cellules à axones courts

SNC : Système Nerveux Central

SPM : Statistical parametric mapping

SVZ : Zone Sous-Ventriculaire

TC : Cellules à Panache (Tufted Cells)

TE : Temps d'Echo

THC : Δ^9 -tetrahydrocannabinol

TO : Tubercule Olfactif

TR : Temps de résonance

TRH : thyrotropin-releasing hormone

Ve : Potentiel électrique Extracellulaire

VMN : Noyau Ventromédial de l'hypothalamus

VSDI : Imagerie par utilisation de Sondes Voltage Dépendantes

VTa : Aire Tegmentale Ventrale

ZDF : Zucker Diabetic Fatty

α -MSH : α -melanocyte-stimulating hormone

Résumé de la thèse

La compréhension des mécanismes cérébraux régulant la prise alimentaire est devenue cruciale face à la pandémie mondiale d'obésité. L'ingestion d'aliments est sous le contrôle d'un large réseau de structures cérébrales, dont l'hypothalamus, le système limbique et les systèmes sensoriels, qui régulent la balance énergétique en régulant l'apport de nourriture et la dépense énergétique. Etant donné l'importance de l'olfaction dans l'appréciation des aliments, il est primordial d'identifier des mécanismes précis liant olfaction et nutrition.

Chez les mammifères, le système olfactif est vital pour les comportements de survie, notamment pour la détection de la nourriture et l'appréciation de sa qualité. Nous avons choisi d'étudier l'activité dans le Bulbe Olfactif principal (BO), la première structure cérébrale qui permet la représentation spatiotemporelle des odeurs. De façon intéressante, des récepteurs aux hormones anorexigènes (leptine, insuline) et orexigènes (ghréline) sont exprimés à la fois dans l'hypothalamus et le BO. En particulier, il a été montré que la leptine diminuait l'expression du marqueur d'activité c-fos dans les cellules du BO chez des animaux à jeun en réponse à une odeur alimentaire. Toutefois, l'impact de la leptine (et de l'obésité) sur l'activité du BO *in vivo* demeure inconnu.

Pour évaluer l'action de la leptine et de l'obésité sur la plasticité olfactive, nous avons choisi le modèle murin ob/ob. Dans cette souche, le gène ob qui permet la synthèse de leptine est inactif, ce qui déclenche une hyperphagie et une obésité précoce. Nous avons d'abord décrit la répartition spatiale de l'activité dans le BO en réponse à une odeur alimentaire et à une odeur neutre chez ces souris en les comparant à des souris témoins grâce une technique de neuroimagerie fonctionnelle, l'Imagerie par Résonance Magnétique renforcée au Manganèse (MEMRI). Par le développement d'une méthode de comparaison statistique indépendant de l'utilisateur, le SPM (Statistical Parametric Mapping), nous avons mis en évidence une augmentation de l'activité spontanée et de l'activité induite par odeur alimentaire dans le BO des ob/ob. Cependant, l'activité induite par une odeur neutre n'était pas plus élevée. L'injection de leptine a pour résultat d'augmenter le signal MEMRI dans les couches profondes du BO et ne restaure que partiellement l'activité des ob/ob.

Nous avons alors voulu décrire les changements anatomofonctionnels dans les circuits du BO chez ces souris en quantifiant l'expression de marqueurs cellulaires par RT-PCR, mais nous n'avons pas trouvé de différence significative entre ob/ob et les témoins. Néanmoins, en quantifiant la neurogenèse dans le BO par injections de BrdU, nous avons mis en évidence une survie accrue des cellules granulaires et périglomerulaires chez les ob/ob, ce qui suggère une action régulatrice de la leptine sur l'élimination des neurones néoformés.

Pour évaluer la dynamique temporelle de l'activité du BO, nous avons enregistré par électrophysiologie les variations de l'activité oscillatoire du potentiel de champ local dans les couches profondes du BO pendant l'apprentissage d'une tâche de discrimination olfactive, le Go/NoGo. L'apparition d'une oscillation lente dite bêta (15-40 Hz) pendant cet apprentissage est un marqueur fonctionnel de l'état du réseau olfactif. Elle est dépendante des retours centrifuges provenant du cortex olfactif, majoritairement du cortex piriforme. Si nous n'avons pas observé de différence importante dans la discrimination olfactive, nous avons en revanche mis en évidence un problème motivationnel chez les animaux ob/ob, qui n'effectuaient la tâche que si la récompense hydrique contenait du sucre. Nos enregistrements montrent une forte augmentation des oscillations bêta chez les souris obèses après apprentissage comparé aux souris témoins.

L'ensemble des données obtenues pendant cette thèse ont permis de mieux décrire de façon intégrée les mécanismes olfactifs dans le BO dans le contexte de l'obésité. La conjonction de techniques complémentaires, notamment en imagerie, électrophysiologie et comportement, nous a permis de mieux comprendre la modulation du fonctionnement du BO dans le cadre de l'obésité et du rôle de la leptine dans ces conditions.

Abstract**Olfactory-feeding crosstalk: describing the profound changes in the spatiotemporal representation of odors in the main olfactory bulb of obese mice.**

Olfaction makes possible both the detection and the processing of odors related to food location and palatability. Interestingly, receptors to anorexigen and orexigen hormones and neuropeptides found in the hypothalamus are also expressed in the main olfactory bulb (MOB), suggesting that feeding state has an impact on odor representation. However, neuronal mechanisms linking olfaction, food intake and metabolic disorders are still unclear.

In this PhD thesis, we wanted to further understand mechanisms of the olfactory-feeding crosstalk and tested the effects of obesity on olfactory activity in the MOB. Leptin, a peptidergic hormone produced by adipocytes, is a major regulator of the energy balance and inhibits food intake. Ob/ob mice are deficient in leptin from birth and are widely used as a murine model of obesity since they are hyperphagic and become rapidly obese. We used a functional neuroimaging technique, Manganese Enhanced Magnetic Resonance Imaging (MEMRI), in association with statistical parametric mapping (SPM) to monitor food odor-evoked spatial activity in the MOB of these mice. Manganese is a paramagnetic ion that is an analog of calcium. It was previously shown to accumulate in specific regions of MOB activated by odorants. It also has the great advantage on other imaging techniques to make possible the follow-up of image spontaneous activity.

Using MEMRI, we found that odor-evoked signal is different, both in terms of intensity and localization between lean and ob/ob mice for the spontaneous activity and in response to food odor. However, this is not the case for a neutral odor. Moreover, leptin impacts both spontaneous activity and food odor-evoked signal intensity in both groups. Interestingly leptin strongly activates deep layers (mitral cell layer and mainly granule cell layer) of the MOB. To pinpoint what cellular/molecular mechanisms can be responsible for these changes in the spatial distribution of activity, we analyzed the effects of the lack of leptin on the composition and activity of the MOB cellular network.

We quantified bulbar adult neurogenesis and found that 21 days after BrdU injections, a cell birth marker, ob/ob mice showed an increased number of both new periglomerular and granular cells as compared to control, suggesting that leptin regulates new neuron elimination. We also tested whether an inflammation could be occurring in the MOB. Using RTPCR of different neuronal and glial markers we did not observe strong signs of inflammation.

Then we probed changes in local network activity in the deep layers of the MOB by recording local field potentials during a Go/NoGo odor discrimination task. We observed that the power of beta oscillations, the functional marker of the olfactory network between the MOB and the olfactory cortex, is way higher in the MOB of ob/ob mice compared to control mice.

Taken all together these results suggest that there is a strong modulation of spontaneous and food odor-activity of the MOB in the obese mice in the absence of leptin. The injection of this hormone strongly activates the deep layers of the MOB. This area of the MOB is also characterized by strong oscillations of the LFP and we have shown that during the learning of an olfactory discrimination task the beta oscillation related to MOB-olfactory cortex network is upregulated in obese mice. We conclude that regulation of the centrifugal fibers could be a major role of leptin in the MOB network and the source of profound changes in activity in obese mice.

Préambule : sens chimiques et alimentation

La détection et la perception des signaux chimiques de l'environnement nécessitent la combinaison de trois systèmes chimiques qui sont très importants dans la relation de l'organisme des mammifères à la nourriture. Même si cette relation est très complexe et implique l'ensemble de toutes les modalités sensorielles, ce sont bien les sens chimiques qui sont particulièrement sollicités pour la recherche, la détection et l'appréciation des aliments ingérés. Ils comprennent trois systèmes complémentaires : le système gustatif, le système trigéminal et le système olfactif (ortho- et rétro-nasal). La flaveur de la nourriture en bouche est définie par l'intégration de ces trois modalités.

Dans ce préambule, je souhaite présenter rapidement le système gustatif et trigéminal puisque les propriétés anatomo-fonctionnelles du système olfactif seront largement détaillées dans mon manuscrit de thèse.

Il semble évident que la langue et les récepteurs gustatifs soient les premiers concernés dans notre relation aux aliments. Pourtant, la palette des détecteurs des molécules sapides est réduite. Les récepteurs gustatifs sont sensibles à l'acide (aigre), au salé, au sucré, à l'amer, et à l'umami qui est la saveur du glutamate très utilisée dans les sauces asiatiques (Mombaerts, 2004). Une famille de récepteurs aux acides gras existe également (Laugerette et al., 2005). Les récepteurs gustatifs sont exprimés par des cellules gustatives (qui ne sont pas des neurones) insérées dans les papilles gustatives au niveau des bourgeons du goût. Les cellules gustatives sont renouvelées tous les quinze jours environ. Les fibres nerveuses qui innervent ces bourgeons proviennent de pas moins de dix nerfs crâniens incluant huit nerfs gustatifs et une branche du nerf trigéminal (nerf V). Les informations remontent principalement par les neurones des ganglions rachidiens vers le Noyau du Tractus Solitaire (NTS) puis le thalamus avant d'être définitivement intégrées dans le cortex insulaire. L'image de territoires linguaux spécialisés pour l'une des saveurs est totalement fautive et c'est bien un codage combinatoire, dans un continuum de détection et de perception gustatives entre toutes les modalités sensorielles chimiques qui est réalisé par le cerveau (lire à ce sujet le chapitre « la gustation chez les vertébrés » par Annick Forion et Jean-Pierre Montmayeur dans le livre « Odorat et Goût » édité par Roland Salesse et Rémi Gervais). Cependant les possibilités de codage gustatif restent limitées, du fait même du nombre réduit de récepteurs gustatifs, et c'est le sens olfactif qui reste la base de la reconnaissance du goût, comme en témoigne le fait que les aliments soient insipides quand nous avons le nez bouché en cas de coup de froid ou que les œnologues aient tendance à rejeter les vins de leur bouche pendant leur dégustation et à utiliser leur nez.

Le système trigéminal est un système d'innervation diffuse de tout le visage présent à la fois dans les cavités oculaire, nasale et buccale. Ce nerf est composé de trois branches, ophtalmique,

maxillaire et mandibulaire. Cette dernière est sensorimotrice et permet d'actionner les muscles de la mâchoire. Le système trigéminal a longtemps été considéré comme un système de secours puisqu'à de fortes concentrations, les molécules chimiques détectées peuvent entraîner la production de larmes, d'éternuements ou de douleur. En fait, il s'agit à nouveau d'un continuum, cette fois d'ordre gustatif-trigéminal, où, par exemple, le menthol déclenche à la fois un goût de menthe et une sensation de frais puisque le récepteur qui détecte cette molécule est sensible à la fois à cette molécule sapide et au froid. Le même mécanisme est valable pour le piment avec les récepteurs des capsaïcines qui sont sensibles à la chaleur. La sensibilité trigéminal est également d'ordre tactile et permet de déterminer la rugosité des aliments en bouche. Récemment, il a été montré que la vitesse de conduction de l'information dans le système trigéminal est plus rapide que le système olfactif chez l'Homme (Flohr et al., 2015). Le nerf trigéminal rejoint le flux d'information ascendante dans le NTS puis emprunte le même chemin que la voie gustative. Il a également un chemin plus spécifique vers le cortex somatosensoriel pour les représentations tactiles intralinguales. Le chapitre intitulé « la sensibilité trigéminal chimique » par Didier Trotier et collaborateurs, dans le livre « Odorat et Goût » édité par Roland Salesse et Rémi Gervais, présente un bon résumé du peu de données disponibles pour l'instant sur le système trigéminal.

Le cortex insulaire, un cortex multisensoriel qui fait partie des circuits limbiques, a un rôle important d'intégration pour les trois modalités des sens chimiques et fait partie des structures responsables de la représentation de la flaveur des aliments et liquides en bouche (Small, 2012).

Par la suite, mon manuscrit sera axé sur l'étude du système olfactif, notamment ses deux premiers étages, celui de la détection dans la muqueuse et celui du premier codage de l'information au niveau central dans le bulbe olfactif. Je décrirai également les systèmes de régulation de la prise alimentaire qui impactent fortement le fonctionnement du bulbe olfactif. L'étude que j'ai menée sur la plasticité olfactive liée à l'obésité s'inscrit dans le cadre des interactions olfacto-alimentaires et montre que, dans un modèle murin de d'obésité, le fonctionnement olfactif est modifié à la fois dans la dimension spatiale et temporelle de la représentation des odeurs.

Chapitre I : Organisation anatomique et fonctionnelle du système olfactif

Parmi toutes les modalités sensorielles, l'olfaction joue un rôle très important dans la survie de nombreuses espèces animales. Elle permet de sonder l'environnement chimique externe pour adopter une réponse comportementale adaptée. De façon non exhaustive, les odeurs offrent la possibilité d'identifier et localiser de la nourriture, par exemple en pistant une proie, de prendre la fuite en cas de détection d'un prédateur ou d'un congénère agressif, d'exécuter une parade nuptiale lorsqu'un partenaire émet les signaux adéquats, ou encore de s'orienter sur de longues distances.

La variété des messages véhiculés par cette seule modalité sensorielle implique une variété mais aussi une complexité des odeurs, qui sont la plupart du temps un mélange de nombreuses molécules odorantes simples. De l'être unicellulaire au plus complexe des êtres pluricellulaires, la détection et la réponse adaptée aux molécules chimiques de l'environnement donne une importance centrale à la reconnaissance entre ces molécules et les récepteurs de ces molécules. Chez les mammifères, c'est le système olfactif qui permet d'effectuer ce lien avec les odeurs de l'environnement avec le défi de la détection et la perception des milliers de molécules inconnues et exogènes sans qu'il n'existe de spécialisation d'un récepteur olfactif par rapport à une odeur donnée. Ce système olfactif est composé d'une partie périphérique, la muqueuse olfactive (MO), organe sensoriel de détection des molécules odorantes qui est situé dans les cavités nasales, et d'une partie située dans le système nerveux central, qui englobe les structures cérébrales dédiées au traitement et à l'encodage des informations olfactives, dont son premier relais, le bulbe olfactif (BO). La souris étant le modèle animal que j'ai choisi d'utiliser au cours de ma thèse, dans ce premier chapitre de l'introduction je m'appuierai sur l'abondante littérature portant sur les deux premières étapes de détection et de représentation sensorielle dans le système olfactif du rongeur pour décrire l'architecture anatomique et les fonctions de la MO et du BO, cette dernière étant la structure dans laquelle j'ai effectuée une série d'enregistrements fonctionnels. Je n'évoquerai que brièvement le rôle du BO accessoire et des différentes structures du cortex olfactif.

L'ensemble de la littérature insiste à la fois sur l'homogénéité et la conservation des gènes des récepteurs olfactifs (RO) dans la phylogénie, à travers l'ensemble du monde animal. Dans ce contexte, je n'exposerai dans cette thèse que les données traitant de l'olfaction chez les mammifères sachant qu'une description détaillée du système olfactif chez d'autres espèces peut être trouvée dans des nombreuses revues dont j'indique ici quelques références principales : drosophile (Masse et al., 2009), abeille (Deisig et al., 2010), criquet (Perez-Orive et al., 2002) ou homard (Derby, 2000) sont les plus étudiés chez les invertébrés, tandis que salamandre (Kauer, 2002), tortue (Wachowiak & Cohen, 1999) et zebrafish (Friedrich, 2006) sont étudiés pour les vertébrés.

1. Le stimulus olfactif

« Ne t'imagines pas non plus que des éléments de même forme entrent dans nos narines, près d'un bûcher où se consomment des cadavres fétides ou près de la scène qu'on vient d'arroser de safran de Cilicie » Lucrèce - De la Nature des Choses.

Il est intéressant de lire la description des « atomes » odorants que Lucrèce évoquait dans son œuvre il y a plus de deux mille ans. Sa conception empirique de la perception olfactive était pourtant étonnamment juste puisqu'il soulignait que chaque « émanation » odorante devait avoir une identité propre et une composition très complexe.

Ce n'est que de nombreux siècles plus tard que la science a commencé à s'intéresser au système olfactif, et plus particulièrement à son organisation anatomique et son fonctionnement, en particulier grâce aux travaux sur les marquages cellulaires de Camillo Golgi et Santiago Ramon y Cajal à la fin du XIX^{ème} siècle. Grâce à la coloration de Golgi, un marquage au nitrate d'argent permettant de visualiser de façon très contrastée les cellules nerveuses et leurs prolongements, ils ont pour la première fois identifié et fourni une représentation détaillée de la morphologie des principaux types de neurones dans le système nerveux et particulièrement dans le BO, en classant les neurones au sein de deux grandes catégories, cellules à axones longs et cellules à axones courts. La première structure cérébrale étudiée par Golgi en 1890 est d'ailleurs le BO. En l'absence de technique fonctionnelle, les discussions portaient sur la structure des neurones et l'absence de prolongement axonaux chez les cellules granulaires a semé le doute sur leur nature neuronale, même si, finalement, Cajal a confirmé que c'étaient bien des neurones (Shepherd et al., 2007). Pour l'étude fonctionnelle, même si l'activité du BO a été décrite dès les premiers enregistrements électrophysiologiques de E. Adrian (Adrian, 1942) jusqu'aux premières cartographies du BO par autoradiographie de G. Shepherd (Sharp et al., 1975) dans les années 1970, les mécanismes des interactions avec la MO et la fonction des cellules réceptrices est demeurée longtemps inconnue. Il a fallu attendre le développement fulgurant des techniques de la biologie moléculaire et de la génétique et les travaux de Linda Buck et Richard Axel en 1991, ainsi que ceux qui ont suivi tout au long des années 1990 par Mombaerts et Dulac par exemple, pour comprendre l'organisation génétique des détecteurs odorants qui ont été identifiés comme les récepteurs olfactifs (RO) des neurones sensoriels olfactifs (Olfactory sensory Neurons ou OSN) (Shepherd et al., 2007).

Qu'est-ce qu'une odeur ? C'est une question difficile qui est l'objet de nombreux articles dans la littérature du fait même de la nature chimique complexe volatile et en 3 dimensions des molécules odorantes. Nous sommes loin de l'interaction biophysique évidente entre les photons de différentes longueurs d'onde et les 3 types d'opsines des photorécepteurs de la rétine. Théoriquement, pour rester

le plus pragmatique possible, toute molécule (ou ensemble de molécules) détectée par les récepteurs olfactifs situés dans la cavité nasale peut être définie comme une odeur. Ces molécules induisent à une concentration donnée une perception consciente de cette détection. En effet, il existe très peu de cas de molécules odorantes qui ne soient pas perçues une fois la liaison avec les RO effectuée, à une concentration suffisante, à l'exception par exemple du monoxyde de carbone. Du fait de leur volatilité, les molécules odorantes peuvent emprunter la voie orthonasale pour accéder directement à la cavité nasale, mais aussi la voie rétronasale, lorsqu'elles sont dans la voie buccale (Negoias et al., 2008).

Les molécules odorantes sont généralement de petites molécules organiques volatiles véhiculées par les courants d'air inspiratoires et expiratoires pour atteindre les RO situés dans la partie supérieure de la cavité nasale. Leur masse molaire peut aller de 30 à 400 Da, mais la plupart d'entre elles ont des masses molaires comprises entre 120 et 220 Da. Elles possèdent des paramètres extrêmement variables, incluant taille, configuration spatiale, groupes fonctionnels (esters, alcools, cétones, aldéhydes, kétones, ou encore des composés avec des structures aromatiques, alicycliques, polycycliques et hétérocycliques, d'innombrables analogues, ou encore des combinaisons de tous ces types) et charge électrique (figure 1.1.A). Les molécules odorantes incluent également des stéréoisomères énantiomères qui induisent deux perceptions différentes, par exemple (-) carvone, à l'odeur de menthe et le (+) carvone, à l'odeur d'anis. Certains énantiomères comme les deux limonènes restent cependant indiscernables chez le rongeur quand ils sont échantillonnés sans association mais deviennent distincts après apprentissage (Linster et al., 2001).

De façon remarquable, ces molécules sont à la fois détectées, catégorisées, discriminées et traduites par des comportements adaptés (Malnic et al., 1999; Johnson and Leon, 2007). La relation entre l'ensemble de ces caractéristiques et le processus perceptif n'est pas directe. Ainsi une simple modification, par exemple d'un atome de carbone supplémentaire dans une chaîne aliphatique pourra entraîner une perception totalement différente de la nature de l'information olfactive. A l'inverse, des molécules d'apparence assez différentes peuvent induire une perception similaire : le 2-phényléthanol et la 2-undécanone représentés sur la figure 1.1.B correspondent tous les deux à la note « rose ». Toutefois, il a été montré que des groupes de molécules ayant une même note odorante avaient des éléments de structure communs, et en particulier un arrangement spatial de ces éléments de structure (figure 1.1.C). Du fait de la complexité de ce codage, les chances de prévoir la qualité odorante d'une molécule et l'ensemble des RO avec lesquels elle interagit sont très faibles (Sell, 2006). Cela explique que la majorité des RO sont « orphelins » car nous ne connaissons pas leur ligand privilégié, entraînant un travail intense de recherche de ces ligands (dénommer aussi 'deorphanization' en anglais) par des laboratoires publics et privés des RO humains.

Ajoutons que beaucoup « d'odeurs » que nous percevons au cours de la vie de tous les jours, notamment les odeurs alimentaires, ne sont que très rarement des molécules simples ou pures mais

plutôt des mélanges de différentes molécules odorantes perçues chacune comme un objet olfactif indépendant. Les caractéristiques de ces mélanges, la manière dont ils influencent la perception olfactive et le traitement cognitif dont ils sont l'objet sont détaillés dans la revue suivante (Thomas-Danguin et al., 2014) : cette notion « d'objet olfactif » indépendant est très limitée puisqu'à plus de trois molécules mélangées, les trois « objets olfactifs » sont perdus et un nouvel objet est formé. La complexité des mélanges de molécules différentes, ajouté à la subjectivité quant aux aspects de nature, d'intensité et d'hédonicité montrent la richesse des informations que peut tirer le cerveau de ce sens chimique, même si les mécanismes exacts du fonctionnement du système olfactif sont très loin d'être compris et font l'objet d'intenses recherches.

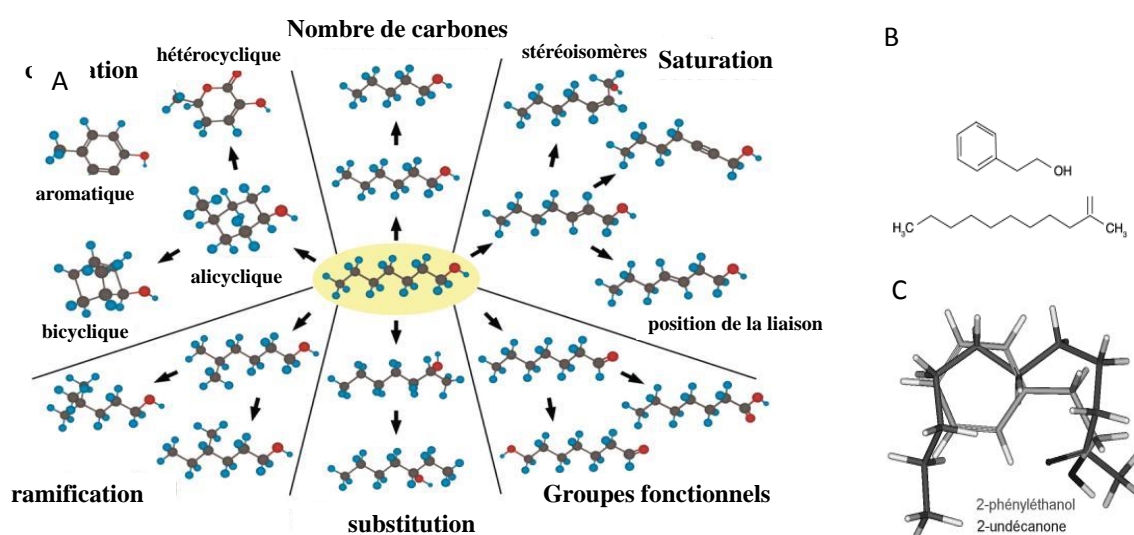


Figure 1.1. Les molécules odorantes diffèrent par de nombreuses caractéristiques chimiques. A) La molécule odorante au centre de l'ovale jaune est le 1-heptanol. Les flèches indiquent les nombreuses variations de structures chimiques possibles, créant des molécules de structures distinctes malgré une composition atomique peu ou pas variable. Certaines caractéristiques telle que la nature du groupe fonctionnel, modifient fortement les propriétés moléculaires de l'odeur, toutefois la grande majorité de ces distinctions sont susceptibles d'être discriminées par l'animal après conditionnement. La diversité des molécules odorantes laisse présager de la complexité du sens olfactif (modifié d'après (Johnson & Leon, 2007)). B) Formules topologiques des molécules de 2-phényléthanol et de 2-undécane, de structures très différentes mais correspondant toutes les deux à la note « rose », représentées sur un plan en deux dimensions, qui ne tient pas compte de leur arrangement spatial indiqué en C) et qui montre une forte similitude de l'organisation spatiale de ces deux molécules, ce qui expliquerait que la note olfactive évoquée par ces molécules soit similaire (figure modifiée du chapitre 4 « Les molécules odorantes, sapides et trigéminales » du livre « Odorat et goût » édité par R. Salesse et R. Gervais aux éditions Quæ, 2012).

Qu'est-ce qu'une odeur alimentaire ? La littérature n'aborde pas ce sujet mais je pourrais la définir comme un ensemble complexe de molécules odorantes qui ont acquis une valence spécifique par rencontre répétée et par association et apprentissage lors d'une prise alimentaire. Dans ce cadre, la stimulation est la fois orthonasale et rétronasale. L'association odeur-aliment est d'ordre hédonique. Elle est appétitive et extrêmement forte si l'odeur est associée à une source d'énergie rapide et palatable comme le sucre : elle est étudiée dans les laboratoires par une tâche de préférence olfactive

conditionnée reposant sur l'association d'une odeur neutre avec un gout sucré (Sclafani and Ackroff, 1994). Elle peut aussi être puissamment aversive en cas d'un malaise associé de type gastrointestinal : dans ce cas, elle est étudiée dans les laboratoires par une tâche d'aversion olfactive conditionnée associant une odeur à l'injection de lithium provoquant le malaise gastrointestinal (Aimé et al. 2007). L'acquisition de cette tâche requiert une stimulation à la fois rétronasale et orthonasale, mais son rappel est déclenché par une stimulation orthonasale (Chapuis et al., 2007). Ainsi l'expérience acquise et la capacité de reconnaissance offrent à l'animal la possibilité de développer des préférences et des aversions alimentaires indispensables à une meilleure adaptation du comportement en se servant d'indices sensoriels pertinents, or il apparaît justement que les informations olfactives sont de prime importance dans ce contexte. Par ailleurs, ces préférences et aversions par rapport aux odeurs alimentaires peuvent se transmettre grâce aux interactions avec les congénères, ce qui constitue un mécanisme écologique et collectif de survie : elles sont étudiées par des tâches de transmission sociale de la préférence alimentaire basée sur les informations olfactives (Galef Jr and Wigmore, 1983).

Un mot pour finir ce paragraphe sur l'olfaction chez l'Homme qui a été considérée comme ayant un faible sens de l'odorat (microsmates) comparativement à d'autres espèces animales comme les rongeurs (macrosmates), mais un article récent, basé plutôt sur une approche computationnelle, a très fortement réévalué à la hausse le nombre d'odeurs que nous sommes capables de détecter (Bushdid et al., 2014) confirmant quantitativement des idées déjà posées par G. Shepherd et confirmées par les expériences de N. Sobel à UC Berkley. Le monde olfactif est très riche au sol où se trouve la majorité des odeurs fixées (Shepherd, 2004). En mettant des sujets au sol et en empêchant la détection par toutes les modalités sensorielles exceptée l'odorat, les auteurs montrent que les sujets humains suivent un chemin de cacao tracé sur une pelouse aussi efficacement qu'un chien ne le ferait (Porter et al., 2007). Il existerait donc une variabilité immense, voire infinie, de molécules odorantes qui pourraient être détectées par les RO des mammifères y compris l'Homme. Je me propose par la suite d'effectuer une description structurale et fonctionnelle des RO et des OSN comme porte d'entrée à la compréhension du fonctionnement du système olfactif.

2. La muqueuse olfactive

2.1 Anatomie et organisation cellulaire

La MO est l'organe sensoriel dédié à la détection des molécules odorantes de l'environnement ambiant grâce aux OSN qui y sont insérés. Ces neurones acheminent l'information olfactive vers le BO, qui est la première structure centrale à encoder les odeurs. Comme nous le verrons plus loin, le BO transmet l'information olfactive vers les voies corticales supérieures et le système limbique.

La MO est un épithélium pseudostratifié qui recouvre la partie postérieure de la cavité nasale, située au sein de l'os maxillaire. Cette dernière est constituée de replis cartilagineux appelés cornets, qui permettent d'augmenter la surface dédiée à la détection des odeurs. L'organisation de cet épithélium est classique : il est soutenu par une lame basale et une sous-muqueuse. En revanche, une spécificité unique distingue cette muqueuse d'autres épithéliums et conditionne son organisation cellulaire : les OSN sont les seuls neurones à être directement en contact avec le milieu extérieur, l'air, afin de pouvoir y détecter des composés chimiques volatiles. De fait, ces neurones doivent être protégés et renouvelés fréquemment du fait de la possibilité d'agressions externes (Farbman, 1994). Je décrirai brièvement dans les paragraphes suivant les différents types cellulaires présents dans la MO. L'organisation en 3D de la MO reste peu documentée car c'est un labyrinthe complexe où les flux et les reflux d'airs sont difficiles à imager ou à modéliser *in vivo*, mais il existe de nombreux articles sur son organisation anatomique (Nomura et al., 2004) et ses propriétés fonctionnelles (Frisch, 1967; Firestein, 2001).

Les glandes de Bowman. Ces cellules situées dans la sous-muqueuse sont responsables de la production du mucus dans lequel baigne la partie apicale des OSN. Le rôle du mucus est de fournir un environnement approprié aux cellules (pH, ions ...) et de protéger l'épithélium du milieu externe (variations de température, d'humidité, poussières, pollens...). Le mucus contient un type particulier de molécules, appelées OBP (Odorant Binding Protein), qui permettent d'augmenter la rétention des molécules odorantes et de les concentrer pour faciliter leur détection par les récepteurs olfactifs adéquats. Synthétisées principalement par les glandes de Bowman, une des OBP est néanmoins synthétisée par les cellules à mucus, qui sont sensibles à la leptine, et en moins grande quantité quand l'animal est à jeun (Badonnel et al., 2007, 2009). Le mucus contient également des anticorps et des enzymes qui vont protéger les récepteurs olfactifs des infections (Tegoni et al., 2000).

Les cellules engainantes. La sous-muqueuse est vascularisée et abrite les cellules engainantes qui entourent, par paquets, les axones amyéliniques des OSN jusqu'à leur projection bulbaire. Leur capacité à guider des connexions entre le système nerveux central et périphérique tout en étant multipotentes les place actuellement au centre d'études cliniques prometteuses portant sur le traitement de lésions de la moelle épinière (Mariano, 2015). Par ailleurs, les neurotransmetteurs libérés par les axones des OSN, notamment le glutamate et l'ATP, induisent une signalisation calcique spécifiques au niveau des cellules engainantes (Thyssen et al., 2010). Cette signalisation calcique permet aux cellules engainantes d'être impliquées dans le couplage neurovasculaire au niveau de la couche des nerfs olfactifs (Lohr et al., 2011).

Les cellules de soutien. Elles s'étendent de la lame basale jusqu'au pôle apical de l'épithélium et servent d'échafaudage aux OSN. Elles régulent également la concentration ionique du milieu interstitiel et peuvent phagocyter des débris cellulaires pour protéger les OSN.

Les cellules basales. Ce sont des cellules souches qui permettent le renouvellement des OSN qui sont très exposés aux agressions extérieures. Il existe deux types de cellules basales : les cellules horizontales et les cellules globulaires. Les premières se caractérisent par une spécialisation importante tandis que les secondes ont un taux de prolifération plus élevé (Schwob, 2002).

Les Neurones Sensoriels Olfactifs (Olfactory Sensory Neurons, OSN). Ce sont les cellules de l'épithélium olfactif dédiées à la détection des molécules odorantes inspirées dans la cavité nasale, et ce sont également elles qui génèrent le signal neuronal qui sera transmis en aval aux différents éléments de la voie centrale. Fragiles et exposés au milieu extérieur, ces neurones se caractérisent par leur renouvellement mensuel, y compris chez l'adulte à l'issue de la différenciation et la maturation des cellules basales. Ces neurones bipolaires de petite taille et de forme ellipsoïdale envoient leurs projections dendritiques vers la cavité nasale. Ces dendrites portent des cils qui baignent dans le mucus directement en contact avec l'air et qui expriment des récepteurs aux odeurs au niveau desquels aura lieu la transduction du message olfactif. Les OSN envoient leurs axones amyéléniques à travers la lamina propria. Ce nerf traverse la lame criblée de l'ethmoïde (une partie perforée de la boîte crânienne) et rejoint le BO, à l'entrée duquel les axones sont entourés par les cellules engainantes. Ces neurones sont aussi sensibles aux pressions, aux changements des flux d'air et présentent par conséquent une activité spontanée, indépendante de toute stimulation odorante (Grosmaître et al., 2007), qui induit de fait une activité spontanée dans le BO.

Je voudrais dans la suite de ce paragraphe expliquer les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu dans la détection des odeurs en revenant notamment sur la découverte de la famille de gènes codants pour les RO et surtout présenter les nouvelles données sur la plasticité de la MO.

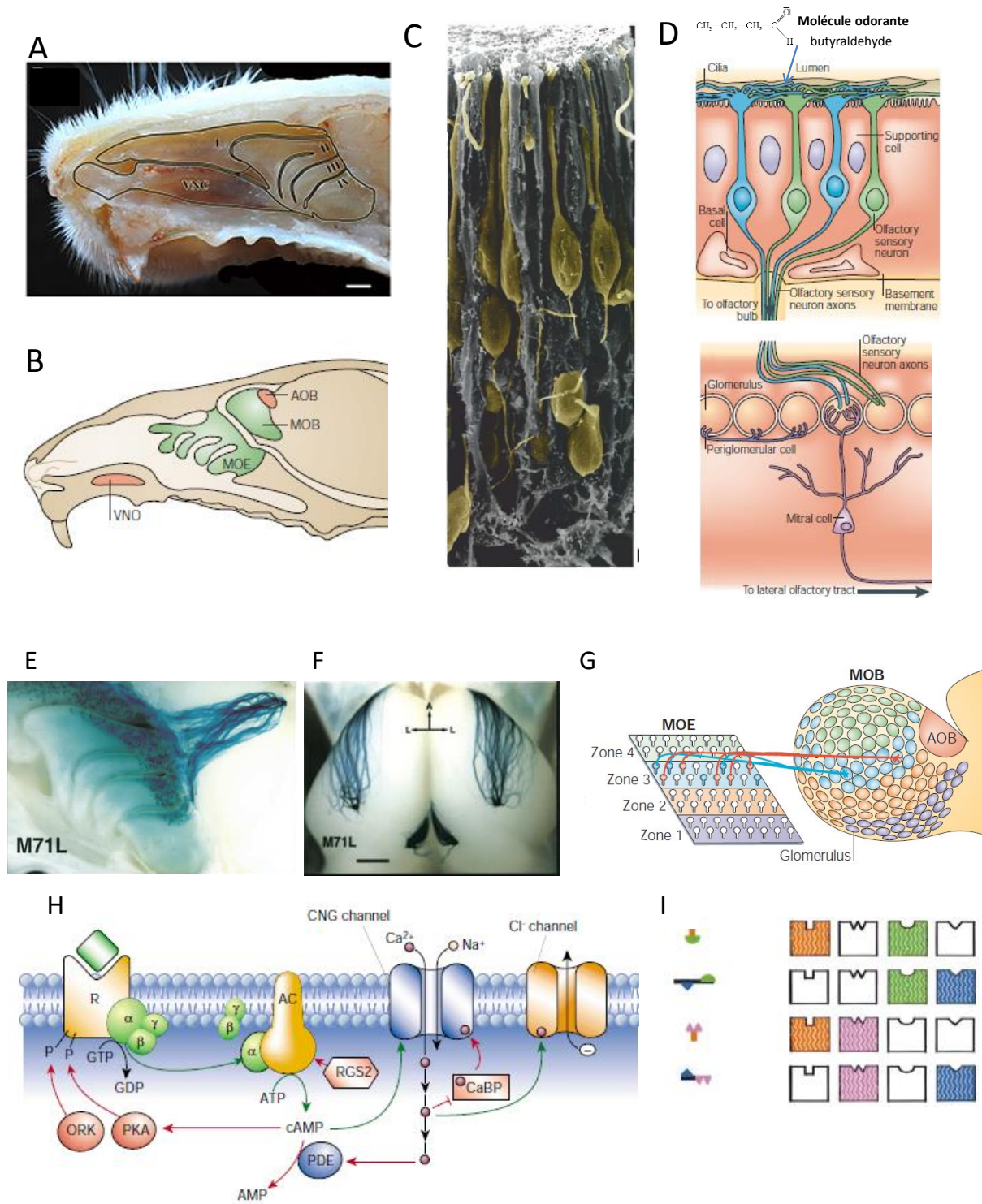


Figure 1.2. Vue anatomique de la MO et de ses connexions au BO. A) Vue sagittale d'une hémitête de souris, montrant la cavité nasale et l'ensemble du MO ainsi que le BO. B) Représentation schématique d'une hémitête de souris avec les deux systèmes olfactifs : Main Olfactory Epithelium (MOE) > Main Olfactory Bulb (MOB) et VomeroNasal Organ (VNO) > Accessory Olfactory Bulb (AOB). C) OSN (colorés en jaune) au corps cellulaire large, visualisés par microscopie électronique. A leur pôle apical, ils envoient leurs dendrites vers la cavité nasale où l'air circule. A leur pôle basal, ils projettent leurs axones fins vers le BO. D) Représentation schématique de la projection des OSN sur les glomérules olfactifs. Les OSN sont entourés de cellules de soutien (supporting cells). A leur pôle apical, leurs dendrites émettent des cils qui baignent dans du mucus et contiennent

des RO détectant les molécules odorantes. Sur la lame basale, les cellules basales (basal cells) servent de progéniteurs prêts à régénérer les OSN. Les axones d'un type d'OSN se projettent tous vers un glomérule particulier (l'ensemble des axones « bleus » sur un glomérule, l'ensemble des « verts » sur un autre) où ils forment des synapses avec des cellules mitrales (mitral cells). E) Vue médiale des projections axonales des OSN vers le BO par marquage Xgal qui colore en bleu les cellules qui expriment LacZ et leur efférences. Les OSN qui expriment le même RO (ici le M71, co-exprimé avec le gène rapporteur LacZ) projettent vers le même glomérule F) Même expérience qu'en E, avec une vue dorsale. G) Les projections spatiales dans le BO des différents types d'OSN respectent une topologie par zones dont le rôle n'est toujours pas clairement établi. H) Transduction du signal olfactif par les OSN : les odorants qui se fixent sur les RO induisent l'activation de la protéine Golf qui active à son tour la cascade Adénylyl cyclase. L'AMPc ouvre des canaux cationiques qui causent une dépolarisation et la sortie de chlore augmente cette dépolarisation. I) Exemple du codage combinatoire des odeurs par les OSN, différents odorants peuvent activer les mêmes RO, mais activent aussi d'autres RO, ce qui les différencie. A : Modifié de (Barrios et al., 2014) B,D,G : Modifié de (Mombaerts, 2004) C : Modifié de Nomura (2004) E,F : Modifié de Feinstein & Mombaerts, (2004). H. B : modifié de Firestein (2001) E. Modifié de Malnic et al. (1999).

2.2 Fonctions des OSN et de leurs récepteurs

2.2.1. Bases moléculaires de la détection d'une odeur par les OSN

Le système olfactif est un senseur de l'environnement: il a une large capacité de détection et de discrimination. Fonctionnellement, il est souvent comparé au système immunitaire : il est, à priori, impossible de prédire la nature des molécules que les RO vont rencontrer mais les capacités de détection sont déjà présentes. Le rapprochement avec le système immunitaire est également mentionné car la reconnaissance olfactive entre congénères pour l'accouplement permet d'aboutir à un brassage génétique par reconnaissance du complexe majeur d'histocompatibilité de l'individu. Toute la difficulté est donc d'aboutir à un système de détection suffisamment précis mais qui reste relativement aspécifique basé sur un nombre de RO limité.

Cette compréhension de l'organisation fonctionnelle du système olfactif a été rendue possible par les travaux de Buck et Axel (1991), qui ont reçu le prix Nobel de Médecine et de Physiologie en 2004 pour leur découverte de la famille de gènes codant pour les récepteurs membranaires olfactifs. Chez le rongeur, on dénombre environ un millier de gènes, ce qui représente 2% du génome. C'est un chiffre extrêmement important pour une famille unique de récepteurs, mais cela reste malgré tout assez faible en regard de la variabilité quasiment illimitée des molécules odorantes. Par ailleurs, de nombreuses études insistent sur la conservation évolutionnelle de cette famille de gènes au sein du règne animal, la plus grande famille de gènes chez les mammifères et présente chez tous les vertébrés. Les gènes des RO de mammifères présentent une structure commune, avec un exon unique d'environ 1 kb, dépourvu d'intron et contenant la totalité de la séquence codante terminée par un signal de polyadénylation (Malnic et al., 2004). Ces similitudes ont d'ailleurs permis une identification relativement aisée des gènes RO au sein de nombreuses espèces grâce à des expériences de polymérase chain reaction (PCR) ou de clonage in silico. Toutefois, des analyses bioinformatiques

comparant les génomes entiers d'espèces variées ont révélés d'importantes variations interspécifiques du nombre de gènes RO, reflétant potentiellement une adaptation à des environnements spécifiques (Niimura, 2012) : les dauphins qui se sont adaptés à la vie aquatique ont par exemple très peu de gènes RO (14) (Hayden et al., 2010), tandis que l'Homme et les grands singes en possèdent environ 400 (Niimura and Nei, 2003; Matsui et al., 2010), la souris et le rat 1130 et 1207, respectivement, tandis que l'espèce ayant actuellement le plus grand répertoire de gènes RO est l'éléphant d'Afrique, avec près de 1948 gènes (Niimura et al., 2014). De façon surprenante, parmi tous ces gènes, chaque OSN n'exprime qu'un gène codant qui lui-même produit un seul type de RO (Chess et al., 1994; Firestein, 2001; Mombaerts, 2004). De plus, un seul allèle du gène RO est exprimé. Enfin, dès qu'un gène RO fonctionnel est exprimé, le RO lui-même exerce un rétrocontrôle négatif en bloquant l'activation de l'expression d'autres gènes de RO. Les mécanismes moléculaires de la sélection d'un gène RO et du rétrocontrôle inhibiteur exercé par les RO exprimés sur les autres gènes RO, que je n'ai pas la place de détailler ici, ont fait récemment l'objet d'une excellente revue (Nishizumi and Sakano, 2015). Ainsi, malgré les millions d'OSN présents dans la MO, chaque cellule ne reconnaît qu'un nombre limité de molécules chimiques. Comment donc expliquer l'efficacité du système olfactif avec un répertoire d'expression si limité ?

En premier lieu, il convient de préciser que même si les OSN ne possèdent qu'un type de récepteur, ils sont malgré tout capables de reconnaître plusieurs molécules odorantes mais avec une affinité variable, par exemple en détectant un groupe fonctionnel particulier. L'inverse est également vrai : si une molécule possède plusieurs groupes fonctionnels, alors elle sera apte à activer plusieurs OSN. Le répertoire d'OSN activé par molécule odorante est spécifique même si un OSN peut participer à la détection de plusieurs molécules odorantes, ce qui pose les bases de la détection combinatoire (figure 1I). Chaque odeur active un ensemble unique d'OSN, non seulement en fonction de sa composition chimique mais également selon sa concentration dans l'air inspiré. Chaque OSN pouvant faire partie d'un ensemble combinatoire pour de très nombreux odorants, ce système permet de détecter un très grand nombre d'odorants (Malnic et al., 1999). En outre, le maintien de la connexion entre un OSN et le système central est dépendant de l'activité et nécessite des stimulations olfactives occasionnelles (Brunjes, 1994). Dans ce sens, le système combinatoire permet de solliciter régulièrement l'ensemble des OSN et de maintenir une fidélité perceptive au cours du temps, que ce soit pour une odeur connue mais non rencontrée depuis longtemps, ou simplement la perception d'une nouvelle odeur. Cette propriété de la détection par les RO/OSN se retrouve dans la représentation spatiale des odeurs au niveau des glomérules du BO, sur laquelle je reviendrai plus tard dans ce chapitre. Enfin, chez les mammifères, il existe deux groupes de RO, que l'on catégorise en récepteurs de Classe I et Classe II. La différence entre les 2 groupes demeure mal comprise, mais il semble que

les RO de classe I reconnaissent principalement des molécules odorantes hydrophiles alors que les RO de classe II reconnaissent des molécules odorantes hydrophobes (Saito et al., 2009).

2.2.2. Mécanismes d'activation des OSN

Les molécules odorantes présentes dans l'air entrent dans la cavité nasale lors de l'inspiration et sont solubilisées dans le mucus où baignent les cils des OSN. Elles se lient alors aux OBP qui les maintiennent dans le mucus. Elles sont ensuite en interaction avec les RO en fonction de leur affinité avec ces récepteurs, ce qui dépend de la nature chimique de l'odeur et de sa concentration, induisant ainsi une cascade de signalisation propre qui aboutit à un changement du potentiel membranaire des OSN (figure 1.2.B et pour revue Firestein, 2001). La liaison molécule odorante-RO active la protéine Golf qui active à son tour l'Adénylyl cyclase et produit de l'AMPc. Ce second messenger se lie à la partie intracellulaire d'un canal cationique laissant entrer des cations Na^+ et Ca^{2+} . Ce passage de cations est d'autant plus important que le nombre de molécules odorantes liés aux RO est élevé. Si le seuil de dépolarisation est atteint, un potentiel d'action (PA) se propage tout au long de l'axone de l'OSN et provoque une libération de neurotransmetteur exciteur, du glutamate, dans les glomérules du BO.

Le système olfactif doit être sensible à de très faibles concentrations d'odeurs, surtout si celles-ci sont en rapport avec un danger imminent comme une odeur de brûlé ou de prédateur. Un système particulier d'amplification de l'activation est présent dans les OSN : il consiste à augmenter la dépolarisation en faisant sortir des ions Cl^- de la cellule. En effet, la dépolarisation induite par l'entrée des cations sodiques et/ou calciques induit l'ouverture d'un canal chlore présent dans les cils des OSN (Reisert et al., 2005) (figure 1.2.B). Or la concentration intracellulaire de chlore dans les cils est plus importante que celle du mucus extracellulaire, une différence intra/extracellulaire qui est exceptionnelle comparée au cerveau où ce rapport est inverse. L'ouverture de ce canal chlore induit donc une sortie de chlore et une dépolarisation supplémentaire qui permet d'atteindre le seuil de déclenchement du PA avec peu de molécules odorantes détectées.

2.2.3. Connexions de la MO

Les projections efférentes sortant de la MO sont bien connues et ont comme destination unique le BO : les PAs générés par les OSN possédant les RO activés (figure 1.2.C. et D.) se propagent le long de leur axone jusqu'aux glomérules olfactifs et provoquent la libération synaptique

de glutamate posant ainsi les bases du codage spatial que nous détaillerons dans la suite du manuscrit. Les afférences de la muqueuse sont bien connues. Différents récepteurs sont présents dans les différents types cellulaires de cet organe mais l'origine des peptides qui se lient à ses récepteurs reste peu connue. Ainsi, des innervations diffuses par les nerfs trijumeaux ont été décrites, mais les cibles précises dans la MO restent à étudier. De nombreux récepteurs à des signaux de la circulation systémique sont présents dans la MO, à l'image des récepteurs adrénergiques (Kawai, 1999), à la vasopressine (Levasseur et al., 2004) ou, localement, à des molécules comme l'endotheline (Laziz et al., 2011). De façon intéressante pour notre propos, la MO exprime aussi des récepteurs à l'insuline (Lacroix et al., 2008) et à la leptine (Baly et al., 2007) : ces résultats du laboratoire « Neurobiologie de l'Olfaction » (NBO, INRA Jouy en Josas) montrent même la possibilité d'une synthèse locale de la leptine et de l'insuline dans la MO. Cependant, les rôles de ces hormones clés dans le système olfactif et en lien avec la prise alimentaire restant à éclaircir, nous aborderons spécifiquement ce thème dans le chapitre III dédié aux interactions olfacto-alimentaires.

Enfin la MO possède son propre système vasculaire très dense et indépendant de celui du BO : c'est donc un lieu d'injection et de passage privilégiée de médicaments ou d'inhalation de drogues, comme la cocaïne, malgré la présence d'un panel impressionnant d'enzymes de dégradation qui limite grandement l'action de ces molécules. Ainsi, des instillations d'insuline sont étudiées, notamment dans le traitement de cas de diabète de type II (Hanson & William H Frey, 2007, 2008; Thorne et al., 2004) ou et de leptine pour le traitement de résistance métabolique périphérique (Hallschmid et al., 2004; Schulz et al., 2004).

2.2.4. Plasticité des OSN

La MO subit des agressions environnementales quotidiennes, d'origine bactérienne, virale, chimique. Cela explique la durée de vie limitée à quelques semaines des OSN qui sont éliminés par un processus apoptotique caspases-dépendant (Cowan and Roskams, 2002; Suzuki, 2004). La mort du neurone et son remplacement à l'âge adulte sont couplés grâce à l'instauration de dialogues moléculaires entre cellules apoptotiques et cellules en différenciation, dont la complexité apparaît à la lecture des processus biologiques mis en jeu lors d'une bulbectomie (Gangadhar et al., 2008) ou lors de traitements pharmacologiques délétères pour les neurones postsynaptiques (Sultan-Styne et al., 2009). En tarissant la source de facteurs trophiques provenant du bulbe, ces traitements induisent une apoptose dont les conséquences sur la survie ont été étudiées par analyse expressionnelle. De nombreux facteurs neuroprotecteurs essentiellement produits par le BO ont été identifiés, mais certains travaux suggèrent que l'épithélium dispose de ressources propres assurant une protection locale

paracrine, voire autocrines des cellules, en particulier des neurones (Murdoch and Roskams, 2007). Certaines neurotrophines, l'acide rétinoïque ou l'endothéline modulent la survie des neurones, et comme mentionné dans le paragraphe précédent, certaines molécules impliquées dans le contrôle de la prise alimentaire et présentes dans la MO y exercent une fonction neuroprotectrice (insuline : Lacroix et al. (2008) ; NPY : Jia and Hegg (2010)). Des régulations activité-dépendantes sont également mises en jeu dans le maintien de l'homéostasie tissulaire. Ainsi, une étude récente montre que malgré l'induction d'apoptose dans la MO par une injection intranasale d'antagoniste de récepteurs à l'endothéline, il existe une plasticité neuronale activité-dépendante qui permet de promouvoir la survie des populations d'OSN dédiées à la détection d'odeur environnantes (François et al., 2013). A l'inverse, suite à une lésion chimique bilatérale détruisant les OSN de la MO, une déprivation sensorielle unilatérale induite par l'insertion d'un tube de silicone dans une narine diminue la régénération des OSN et augmente la proportion d'OSN apoptotiques par rapport à la narine non déprivée (Kikuta et al., 2015).

Alors que la muqueuse était vue comme un organe périphérique peu plastique, les données récentes prouvent le contraire. A titre d'exemple nous citerons deux études : (Jones et al., 2008) montrent qu'après une tâche de peur conditionnée ou l'odeur d'acétophénone (ligand privilégié du récepteur M71) est associée à un choc électrique, le nombre d'OSN exprimant le M71 marqué augmente. De plus, la taille des glomérules recevant les afférences des OSN M71 positif augmente également. Une seconde étude menée par (Dias and Ressler, 2014) montre la plasticité transgénérationnelle d'origine épigénétique après une tâche de peur conditionnée (association odeur-choc électrique) chez la souris: en utilisant des souris transgéniques marqués pour le récepteur M71, les auteurs montrent que la descendance des souris ayant subis la tâche montre une plus grande sensibilité à l'odeur d'acétophénone et qu'il existe davantage d'afférences dans « le glomérule M71 » chez ces souris que chez les témoins. Nous pouvons conclure cette partie sur la muqueuse et les OSN en affirmant que les résultats concernant la plasticité de cette structure primordiale pour le fonctionnement olfactif vont aller en augmentant et que de nouveaux concepts vont apparaître dans la littérature. Je reviendrais sur cette plasticité au niveau fonctionnel dans le paragraphe traitant de la plasticité des cartes spatiales dans le bulbe olfactif.

3. Le bulbe olfactif principal

On distingue deux BO chez le rongeur (figure 1.1.B.). Le premier, le BO principal, est la structure la plus antérieure du cerveau. C'est également la première structure à encoder les odeurs : après avoir reçu des signaux en provenance des RO ayant été activés par une molécule odorante, ces

derniers vont être encodés au sein du BO afin de donner lieu à une représentation spatiotemporelle spécifique de l'odeur perçue en périphérie. Le BO va ainsi établir une cartographie des odeurs (on parle de chimiotopie), observable grâce à différentes techniques d'imagerie qui montre une forte modulation temporelle. Ce premier traitement de l'information olfactive est ensuite transmis au cortex olfactif et au système limbique pour accorder une identité et une valence à la stimulation sensorielle.

Le second BO, le BO accessoire, reçoit notamment les afférences des OSN de l'organe voméronasal, qui est impliqué dans la détection des phéromones, des molécules utilisées par de nombreux organismes pour communiquer des informations sur les espèces, les dispositions sexuelles ou encore l'identité d'un individu. Il existe aussi une organisation spatiale des phéromones au sein de l'AOB, mais celle-ci n'est pas chimiotopique comme celle du BO principal (Hammen et al., 2014). L'AOB n'ayant pas fait l'objet de travaux durant ma thèse, je n'indiquerai ici qu'une liste d'articles qui décrivent son organisation anatomofonctionnelle (Scalia and Winans, 1975; Belluscio et al., 1999; Rodriguez et al., 1999; Wagner et al., 2006).

3.1. Anatomie et organisation cellulaire

Chez les mammifères, le BO est un palécortex sphéroïde, constitué de deux hémibulbes symétriques de six couches concentriques dont seulement quatre ont des corps cellulaires. Je décris par la suite l'organisation structurelle de la couche la plus superficielle vers la plus interne (Shepherd, *The synaptic organization of the brain*, 2004, Ed. 5, Oxford University Press. et figure 1.3.A et B.). La description sur coupes coronales que j'utiliserai ici ainsi que la visualisation rostro-caudale du BO sont décrites sur un axe rostro-caudal par l'atlas (Allen Reference Atlas) mis à disposition en ligne par le Allen Institute for Brain Science à l'adresse suivante (<http://atlas.brain-map.org>). Il est également possible de consulter l'atlas de référence de Paxinos et Franklin (Georges Paxinos 2012) mais celui-ci ne décrit que succinctement le BO.

3.1.1. Les couches du BO

La Couche des Nerfs Olfactifs (Olfactory Nerve Layer, ONL) est la couche la plus externe. Elle est constituée des terminaisons distales des axones des OSN projetant sur le BO. Ces axones sont entourés par des cellules engainantes, et pénètrent ensuite dans la couche glomérulaire pour former des synapses avec différents types cellulaires au sein des glomérules olfactifs (Pinching and Powell, 1971).

La Couche Glomérulaire (Glomerular Layer, GL) contient les modules fonctionnels du BO, des structures sphériques d'une centaine de micromètres de diamètre appelées glomérules. Ces derniers sont des neuropiles, formés par un enchevêtrement de synapses entre les milliers d'axones des OSNs et une centaine de dendrites des cellules mitrales et à panache (Mitral/Tufted Cells, M/TC). Même si les M/TC projettent leurs axones vers le cortex olfactif, la position de leur corps cellulaire, leurs connexions et leur manière de coder les odeurs diffèrent (voir paragraphe suivant). Les cellules TC, identifiées notamment par leur expression de cholecystokinine, sont activées par des odeurs à plus faible concentration que les M/TC, et présentent une latence de réponse plus faible que ces dernières. Les cellules M/TC étendent leurs dendrites secondaires de manière plus prononcée et reçoivent de fait plus d'afférences inhibitrices de la part des cellules granulaires. Enfin, alors que les TC reçoivent des afférences directes des OSN, les afférences excitatrices des MC semblent être indirectes et proviendraient des cellules à panache externes (ETC) associées à un glomérule commun (Imai, 2014a). Chaque glomérule est délimité par une capsule gliale composée d'astrocytes au milieu desquels s'intercalent plusieurs types de cellules juxtaglomérulaires (JC): i) les cellules périglomérulaires (PG) qui sont des interneurons inhibiteurs GABAergiques et dopaminergiques qui permettent une inhibition locale du signal entrant en permettant une normalisation qui pourrait expliquer l'invariance par rapport aux concentrations d'odeurs ; ii) les ETC qui sont des cellules excitatrices dont les corps cellulaires sont dans l'EPL mais qui envoient leurs dendrites primaires à l'intérieur des glomérules où elles reçoivent une entrée monosynaptique de l'axone des OSN et forment des synapses excitatrices avec les projections des autres types cellulaires dans les glomérules ; iii) les cellules à axone court (Short Axon cells, SAC) sont principalement glutamatergiques et portent faussement leur nom puisque non seulement leurs dendrites émettent des prolongements et reçoivent des afférences des ETC mais surtout elles projettent sur plusieurs glomérules, à distance: elles y activent les cellules PG et permettent potentiellement une inhibition latérale interglomérulaire (Kiyokage et al., 2010).

La Couche Plexiforme Externe (External Plexiform Layer, EPL) contient les corps cellulaires des cellules à panache, qui projettent leur dendrite principale vers un unique glomérule, et dont les axones véhiculent le signal de sortie vers le cortex olfactif. L'EPL contient également les dendrites apicales et secondaires des M/TC et les dendrites secondaires des cellules granulaires en provenance des couches plus profondes du BO.

La Couche des Cellules Mitrales (Mitral Cell Layer, MCL) est une couche monocellulaire fine, composée des corps cellulaires des MC qui sont les principaux neurones de sortie du BO. Les MC ont la forme pyramidale caractéristique des cellules principales d'une structure corticale. Chaque MC projette une seule dendrite dite apicale au sein d'un glomérule. Les MC projettent également des dendrites latérales dites secondaires, qui se terminent dans la couche EPL en interactions

dendrodendritiques avec les cellules granulaires. L'axone d'une MC traverse les couches profondes du BO pour établir une connexion synaptique avec un autre neurone d'un cortex olfactif.

La Couche Plexiforme Interne (Internal Plexiform Layer, IPL), extrêmement fine, ne contient pas de corps cellulaires : c'est une couche intermédiaire où se croisent de nombreuses fibres, principalement les dendrites des cellules granulaires projetant vers les couches extérieures, ainsi que les axones des MC et TC qui à l'inverse se dirigent vers les couches profondes du BO et les voies corticales supérieures.

La Couche des Cellules Granulaires (Granule Cell Layer, GCL) est extrêmement dense et contient les corps cellulaires des interneurons granulaires (GC) GABAergiques. Ces cellules ne disposent pas d'axones, mais développent en revanche une arborisation dendritique très dense qui leur permet d'établir une importante connectivité synaptique avec les dendrites secondaires des MC au sein de l'EPL. Pour finir, une zone sous-épendymaire et ventriculaire, la plus interne du BO, constitue la partie terminale du flux rostral migratoire, qui achemine les cellules néoformées en provenance de la zone sous-ventriculaire (SubVentricular Zone, SVZ) (Luskin, 1993).

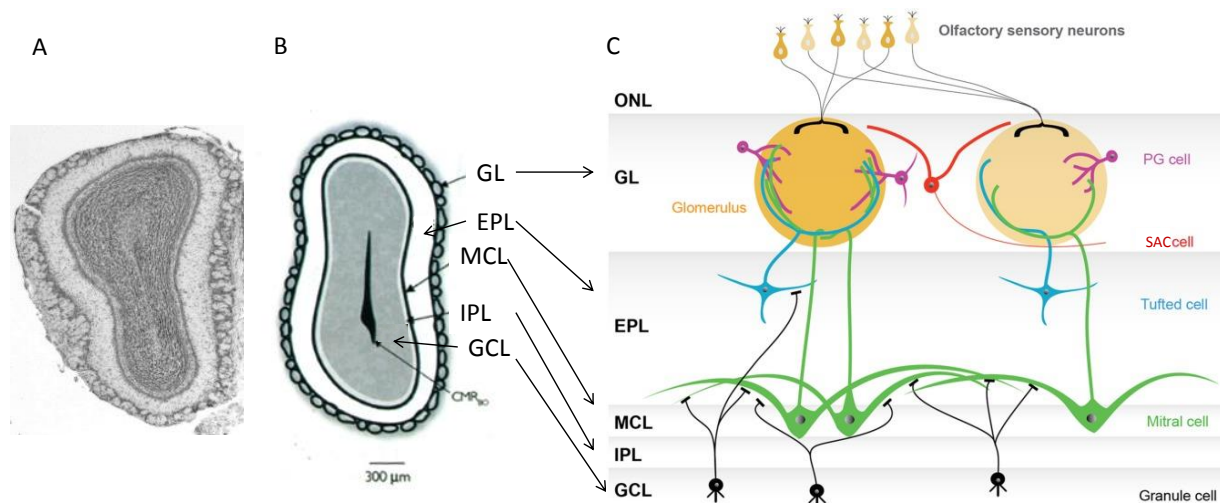


Figure 1.3 Organisation Synaptique au sein du BO. A) Coloration des différentes couches cellulaires du BO par crésyl violet sur une coupe coronale de BO de rat. B) Schéma de la même coupe de BO figurant les différentes couches du BO. GL : couche glomérulaire ; EPL : couche plexiforme externe ; MCL : couche des cellules mitrales ; IPL : couche plexiforme interne ; GCL : couche des cellules granulaires ; CMR_{BO} : partie bulbaire du courant de migration rostrale. C) Représentation schématisée du réseau neuronal dans le BO. Les OSN projettent leurs axones dans la GL, où ils forment des synapses avec les cellules mitrales du BO, dans un volume de neuropile dénommé glomérule. Trois types de neurones entourent les glomérules dans la GL : les PG (cellules périglomérulaires), les ETC (cellules à panache externes, non montrées) et les SAC (cellules à axone court). Les cellules mitrales (MC) et les cellules à panache (TC/ Tufted cells) forment des synapses au sein des glomérules, mais les corps cellulaires des MC sont situés dans la MCL, alors que ceux des TC sont situés dans l'EPL. Les dendrites secondaires des M/TC s'étendent dans l'EPL, où elles forment des synapses dendrodendritiques avec les cellules granulaires (GC). L'IPL contient principalement les axones des M/TC et les dendrites des GC, qui s'étendent de la GCL à l'EPL. La GCL, très dense, contient principalement les corps cellulaires des GC. B) (Figure modifiée de la planche VI du livre « Odorat et goût » édité par R. Salesse et R. Gervais aux éditions Quæ, 2012). C) figure modifiée de (Nagayama et al., 2014).

3.1.2. Efférences et neurotransmission dans le BO

Les axones glutamatergiques des M/TC forment des fascicules et constituent le Tractus Olfactif Latéral (ou lateral olfactory tract, LOT), la seule voie de sortie « bottom-up » du BO vers le cortex olfactif. Les multiples collatérales de ces axones projettent de façon diffuse vers de nombreuses aires du cortex olfactif (figure 1.4), incluant le noyau olfactif antérieur (AON), le TO, le cortex piriforme (PC), le cortex entorhinal latéral, le noyau cortical antérieur de l'amygdale, le cortex périamygdalien et la tenia tecta. Ces projections respectent une topographie particulière (Shipley&Ennis 1996), exception faite de l'AON antérieur, où les projections des cellules M/T conservent une grossière organisation, les cellules M/T médiales et latérales du BO projetant respectivement sur la partie médiale et latérale de l'AON antérieur (Brunjes et al., 2005). Postérieurement à l'AON, les projections des MC et des TC sur le cortex olfactif diffèrent (Nagayama et al., 2010; Igarashi et al., 2012): En plus de l'AON antérieur, les TC projettent sur la partie postéroventrale de l'AON, sur la partie ventrorostrale du PC antérieur et la partie apicale du tubercule olfactif (TO), tandis que les MC projettent leurs axones de façon dispersée vers toutes les régions du cortex olfactif. Ceci permet de supposer que différents aspects des informations olfactives traitées par les M/TC sont différemment traitées au sein du cortex olfactif, par des régions distinctes (Imai, 2014b). Chacune de ces sous-régions corticales projettent sur le système limbique et le néocortex : l'AON au PC ipsilatéral et contralatéral, le TO au noyau dorsomédian du thalamus ; le PC, la structure qui reçoit le plus grand nombre d'entrées bulbaires, se projette dans le noyau dorsomédian du thalamus et a aussi des connexions directes avec une partie du cortex orbitofrontal (Isaacson, 2010) et du cortex insulaire, qui, de façon intéressante, reçoit également les informations gustatives en provenance du thalamus. Le cortex entorhinal se projette principalement dans l'hippocampe. Enfin, le noyau cortical antérieur se distribue dans le cortex insulaire mais aussi dans l'ensemble de l'amygdale dont les noyaux se projettent dans toutes les régions du cerveau. Une des spécificités des cellules nerveuses du BO est l'absence de projection directe sur le thalamus, les M/TC projetant directement leurs axones vers le cortex. De fait, une structure comme l'amygdale, qui est impliquée dans les émotions, reçoit directement et massivement des afférences du BO, ce qui pourrait expliquer la puissance et la longévité de la mémoire olfactive (Chapuis et al., 2009). Il est à noter que toutes ces régions envoient des projections centrifuges en retour sur le BO, excepté le TO.

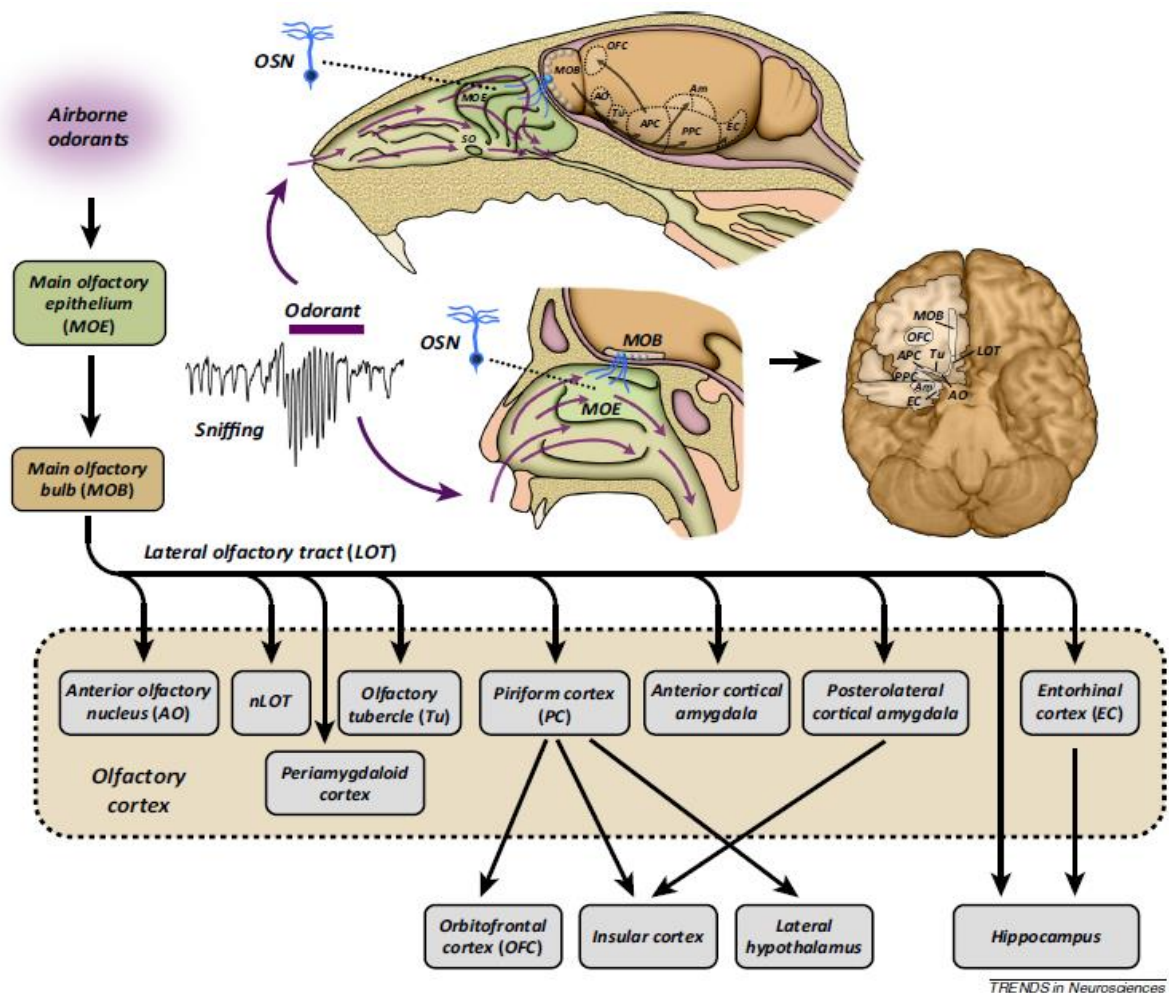


Figure 1.4 Les principales voies neuronales ascendantes du système olfactif des mammifères. Les voies sensorielles du système olfactif principal sont illustrées chez la souris et chez l'Homme. Les molécules odorantes pénétrant dans les cavités nasales après un flairage sont adsorbées grâce aux OBP au niveau de la MO. Elles sont détectées par les OSN qui envoient leurs afférences vers les glomérules correspondants au niveau du BO. A la sortie des glomérules, les projections des M/TC sont distribuées de façon diffuse via le LOT vers un ensemble de structures secondaires formant le cortex olfactif et qui incluent le noyau olfactif antérieur (AON), le cortex piriforme (PC), le tubercule olfactif (Tu), le cortex entorhinal latéral (EC), le noyau cortical antérieur de l'amygdale (Am), le cortex périamygdalien et la tenia tecta. Ensuite, l'information olfactive est transmise à des structures tertiaires, le cortex orbitofrontal (OFC), le cortex insulaire et l'hypothalamus recevant la majeure partie des projections du PC. Figure issue de (Mainland et al., 2014). Il est à noter ici que le BO est une entrée sensorielle directe et puissante sur le système limbique.

En plus des neurotransmetteurs principaux du BO que sont le glutamate et le GABA, de nombreux récepteurs à différents neurotransmetteurs et modulateurs y sont synthétisés localement pour des interactions entre cellules du BO ou entre cellules du BO et les projections centrifuges qu'elles reçoivent, notamment du PC. Brièvement, la dopamine est un neuromodulateur local comme dans la rétine. Elle est synthétisée et libérée au niveau glomérulaire par les PG qui peuvent co-exprimer le GABA (Maher et al., 2011). Des récepteurs dopaminergiques D2 et GABA-B sont présents au niveau des terminaisons présynaptiques des OSN. Ils ont un effet inhibiteur sur les terminaisons axonales (Hsia et al., 1999). Le BO reçoit également des projections d'un autre

modulateur cathécholaminergique, la noradrénaline dont projections issues du locus coeruleus (McLean et al., 1989; Shipley et al., 1985; Sullivan et al., 2000). Ces projections sont très étudiées dans le cadre de la mémoire olfactive précoce des rats nouveaux-nés (Rainecki et al., 2010). De plus, des projections cholinergiques sont localisées au niveau de toutes les couches du BO (Gómez et al., 2005) et sont présentes de manière dense dans la couche glomérulaire. Cette neurotransmission cholinergique serait impliquée dans la discrimination des odeurs (Chaudhury et al., 2009). Enfin, des projections sérotoninergiques partent du noyau du raphé et atteignent le BO, particulièrement la couche glomérulaire (McLean and Shipley, 1987), et pourraient être impliquées dans la représentation spatiale des odeurs (Petzold et al., 2009) et le filtrage des informations qui en découlent.

Les différentes couches bulbaires présentent également des récepteurs à l'ensemble des molécules de signalisation du métabolisme qu'elles soient de nature orexigènes et anorexigènes. Je détaillerai leur rôle et leur nature dans le deuxième chapitre et leurs interactions avec le système olfactif dans le troisième chapitre.

3.1.3. Neurogenèse

Les interneurons du BO sont renouvelés de façon constante, même chez un organisme adulte, mais de façon plus prononcée chez le rongeur que chez l'Homme (Curtis et al., 2007). La neurogenèse est un long processus qui comporte plusieurs étapes depuis la zone sous-ventriculaire (ou subventriculaire) des ventricules latéraux (SVZ) jusqu'au BO : la prolifération, la migration, la différenciation et l'intégration de nouveaux neurones. Le BO est la zone du cerveau adulte où se déroule le renouvellement le plus important en quantité des nouveaux neurones. Dans le gyrus denté de l'hippocampe ce renouvellement important pour des mécanismes mnésiques est moindre. La voie d'entrée des neurones néoformés dans le BO correspond à la zone sous-épendymaire en position centrale de l'architecture bulbaire, une zone terminant la partie rostrale des ventricules latéraux.

Les neuroblastes issus de la SVZ migrent jusqu'au BO le long d'un chemin bien stéréotypé appelé le flux rostral migratoire (Rostral Migratory Stream) pendant 5-6 jours, pour se différencier en interneurons GC et PG au bout de 21 jours avec leur insertion fonctionnelle dans les circuits bulbaires (Winner et al., 2002). Il semble que les PG ne représentent qu'une petite proportion parmi les cellules renouvelées au sein du BO et que la neurogenèse impacte principalement le renouvellement des cellules granulaires (Imayoshi et al., 2008; Whitman and Greer, 2009). Une fois au cœur du BO, les neurones nouvellement générés entament une migration radiale leur permettant d'atteindre les couches GCL et GL du BO. Chez la souris, on estime à environ 30 000 le nombre quotidien de nouveaux

neurones qui atteignent le BO. L'expérience olfactive des sujets à un large impact sur le taux de survie des nouveaux neurones (Kikuta et al., 2015) et une déprivation sensorielle induit une baisse de neurogenèse, qui ne résulte pas d'un défaut des progéniteurs à se différencier en neuroblastes, mais témoigne d'une diminution du taux de survie des nouveaux neurones. A l'inverse, les chances de survie des neurones néoformés augmentent lorsque les animaux sont exposés à un environnement enrichi en odeurs ou lorsqu'ils sont entraînés à discriminer des odeurs (Mouret et al., 2008). Cette survie semblerait tout autant dépendre des entrées sensorielles que des afférences centrifuges, notamment noradrénergiques, dont font l'objet ces nouveaux neurones (Veyrac et al., 2009).

Mais à quelles fonctions sont destinées les nouveaux neurones qui affluent constamment dans le BO ? L'apport permanent de neurones nouvellement générés suppose le remplacement des interneurones matures en vue de préserver l'organisation synaptique du bulbe. Or, les interneurones granulaires jouent un rôle critique dans les processus d'inhibition latérale et la synchronisation des cellules mitrales dans le BO. Au niveau des interneurones GABAergiques nouvellement formés, une équipe a observé que des synapses glutamatergiques induisaient une plasticité qui disparaît pendant la maturation et qui n'existe pas chez les interneurones adultes (Nissant et al., 2009). L'incorporation permanente des interneurones nouvellement générés s'accorde avec l'idée d'un renforcement des mécanismes inhibiteurs qui conduisent à un meilleur contraste des signaux olfactifs, facilitant en conséquence la perception et l'apprentissage de ces dernières (Breton-Provencher et al., 2009; Moreno et al., 2009).

D'autres travaux se sont également intéressés à la contribution de la neurogenèse bulbaire adulte dans certains processus éthologiques. La production cellulaire accrue qui intervient au cours de la période périnatale chez les rongeurs suggère une contribution fonctionnelle des nouveaux neurones dans la mise en place des conduites maternelles et de la reconnaissance des jeunes ((Shingo et al., 2003; Mak and Weiss, 2010). Enfin, une étude très intéressante a montré qu'il existait une plus grande élimination des cellules granulaires en maturation dans le BO pendant la phase postprandiale notamment pendant le sommeil suivant la consommation alimentaire chez la souris. Cette augmentation était également augmentée par une déprivation sensorielle de l'odorat (Yokoyama et al., 2011), un mécanisme qui pourrait être dépendant des retours centrifuges ainsi de l'effet d'hormones circulantes (Komano-Inoue et al., 2014). Je reprendrai ces données dans la discussion par rapport à nos observations des modifications de la neurogenèse chez les souris obèses ob/ob que je décris dans la partie 3 consacrée aux résultats.

3.2. Fonctions du BO : un carrefour olfactif et métabolique

3.2.1. Codage spatiotemporel des odeurs dans le BO

3.2.1.1 Représentation spatiale des odeurs

L'organisation structurelle des afférences dans un glomérule fournit une base fonctionnelle pour l'encodage chimiotopique selon un patron particulier et identifiable de glomérules olfactifs en miroir des OSN : tous les OSN exprimant un RO donné projettent leurs axones sur un total de quatre glomérules olfactifs (deux par hémibulbe), lesquels reçoivent eux-mêmes les projections d'une seule famille d'OSN (Mombaerts, 2004). En outre, les marquages génétiques ont permis de mettre en évidence d'autres propriétés structurelles du codage olfactif : la symétrie de la projection bilatérale, qui implique que l'encodage et la représentation d'une odeur ne diffère pas ou peu d'un hémibulbe à l'autre, la symétrie à l'intérieur d'un hémibulbe dans l'axe latéral-médian et une détection combinatoire des molécules odorantes (Mombaerts, 1999; Mombaerts, 2004).

Cependant, même si l'apport des techniques de biologie cellulaire et moléculaire à la connaissance des mécanismes qui sous-tendent l'olfaction est incontestable, il n'en demeure pas moins limité. L'avènement de nouvelles imageries à haute résolution spatiotemporelle (notamment en imagerie optique) a permis d'étudier en détails ces mécanismes au niveau du BO. Ces résultats que j'expose dans les paragraphes suivant en abordant chaque technique et les résultats significatifs qu'elle a pu apporter a donné naissance à la vision d'une fonction des cartes spatiales.

Dans ce paragraphe, je m'efforcerai de décrire les différentes techniques d'imagerie relatives à l'étude du traitement et du codage spatial des molécules odorantes (revue dans Pain, L'Heureux, & Gurden, 2011) et les résultats les plus importants qui ont pu en être déduits sur le fonctionnement du BO. Je décrirai le cheminement et les contraintes qui m'ont conduit à utiliser le MEMRI dans un paragraphe dédié. Pour plus de clarté, le tableau I.1. indique les différentes techniques utilisées couramment pour l'étude du BO, avec pour référence une revue et une publication de notre équipe (exceptée pour la publication en IRM fonctionnelle de Claire Martin et collaborateurs effectuée à Lyon).

TECHNIQUE	Résolution spatiale (µm)	Résolution temporelle	Région cible du BO	Stimulus/Animal	Activité spontanée	Références principales
2-Deoxy-[¹⁴ C]Glucose	5	Plusieurs minutes	Entier (un animal, une odeur)	Un seul	non	Johnson and Leon, 2003 Martin et al., 2012
BOLD-fMRI	100	~1 s	Entier (une unique acquisition)	Quelques-uns	non	Yang et al., 1998 Martin et al., 2007
IOSI / VSDI / Imagerie calcique	20	100 ms	Dorsal	Plusieurs	non	Wachowiak and Shipley, 2006 Pain et al., 2011
Manganese Enhanced-MRI	100	Plusieurs minutes	Entier (une unique acquisition)	Un seul	oui	Pautler and Koretski, 2002 Gobbo et al., 2012
Imagerie par Ultrasons	100	<1s	Entier (Des acquisitions multiples)	Quelques-uns	oui	Osmanski et al., 2014

Tableau 1.1. Résolution spatiotemporelles et propriétés des techniques d'imagerie utilisées pour la cartographie de la distribution de l'activité spatiale dans le BO in vivo. BOLD-fMRI : Blood Oxygen Level Dependent functional MRI. IOSI: intrinsic optical signal imaging. VSDI : voltage sensitive dye imaging.

Ces dispositifs expérimentaux d'imagerie, qui diffèrent dans la source biophysique du signal qu'ils exploitent, ont confirmé la fiabilité de l'hypothèse d'une représentation spatiale des odeurs dans le BO. Ces études ont décrit des cartes d'activation spatiales aux propriétés bien définies reproductibles d'un animal à l'autre même avec l'utilisation de différentes techniques.

3.2.1.2 Premières cartographies du BO par utilisation des propriétés métaboliques et vasculaires

Ces techniques fonctionnelles se basent sur le fait que les régions les plus activées font appel à plus de substrat énergétique que les autres régions. Le substrat énergétique essentiel du cerveau est le glucose. Grâce aux voies métaboliques que sont la glycolyse et le cycle de Krebs, le rendement de chaque molécule de glucose est optimal et est converti en ATP qui est la molécule énergétique des cellules. Cette production est effectuée en aérobie (présence d'oxygène) dans les mitochondries. Un changement important du débit sanguin dans les capillaires et des artérioles des réseaux activés est également observé. Glucose, oxygène et débit sanguin sont des signaux exploités pour identifier les régions activées dans le cerveau et fournir une cartographie de l'activation neuro-gliale.

Lors d'une stimulation olfactive, les OSN sur lesquels se sont liés des odorants produisent des PA qui se propagent dans leurs axones. Ceci induit la libération de glutamate dans les fentes synaptiques des glomérules où ils projettent. Il en découle une activation des M/TC ainsi que des JC, dont les

astrocytes qui jouent un rôle majeur dans le métabolisme énergétique cérébral (pour revue Barres, 2008). Cette activité glomérulaire nécessite une forte consommation d'ATP et d'oxygène (Lecoq et al., 2009). Le codage spatial dans le BO peut donc être étudié grâce à des techniques d'imagerie qui détectent ces signaux. Le BO présente deux avantages majeurs pour la détection de ces signaux d'imagerie : i) la couche glomérulaire, où a lieu la première et plus importante étape du codage spatial, est superficielle (couche dorsale débute en dessous de l'ONL de 100 à 150 μm sous la surface du BO) et facilement accessible par imagerie, notamment optique ii) Cette couche est la plus vascularisée et la plus gourmande en énergie iii) la densité de synapses dans cette couche est élevée.

Imagerie au 2-Deoxy-[14C]Glucose

Le glucose est phosphorylé par l'hexokinase et la production de glucose-6-phosphate. La technique de cartographie par assimilation de glucose radiomarké utilise cette étape de la réaction pour quantifier l'incorporation de glucose par les différentes régions du cerveau. Afin de quantifier le glucose incorporé, cette technique nécessite l'utilisation de glucose radio-marqué 14C-2-DéoxyGlucose (2DG) (Sokoloff et al., 1977). Cette forme de glucose reste emprisonnée dans le cytoplasme après phosphorylation par l'hexokinase. Il est alors possible de quantifier par autoradiographie la quantité de 2DG incorporé qui est plus importante dans les zones activées par rapport aux zones non activées. Elle a été utilisée pour le BO chez le rat, par Sharp et al. (1975) puis par Stewart et al. (1979), très rapidement après son développement et a permis la première mise en évidence du codage spatial des odeurs dans cette structure. Cependant, cette méthode a des limitations importantes car elle nécessite le sacrifice de l'animal pour réaliser l'autoradiographie : seule une image pour une seule stimulation est donc disponible par animal. Le site web du laboratoire de Michael Leon, <http://gara.bio.uci.edu/>, the glomerular activity response archive, contient une vue exhaustive des odeurs cartographiées par 2DG et propose une partition du BO en modules qui sont activés par des fonctions chimiques précises portées par les molécules odorantes (Johnson et al., 2002).

Imagerie par Résonance Magnétique fonctionnelle (IRMf)

Cette technique est basée sur la détection du signal BOLD (pour Blood Oxygenation Level-Dependant). Elle met à profit les propriétés paramagnétiques de la déoxyhémoglobine qui génère une modification du champ magnétique local. L'activité neuronale nécessite un apport d'oxygène et se traduit par un changement de l'oxygénation du sang suivi du volume et du débit sanguins. En réaction à cette consommation locale, l'oxygène apporté par le sang aux zones activées dépasse largement les

besoins des cellules et inverse ainsi le rapport déoxy/oxy hémoglobine dans les capillaires et les veinules. Le contraste BOLD ($T2^*$) suit ces modifications avec un signal qui est souvent biphasique (négatif puis positif) dans les régions activées, ce qui permet leur visualisation (Heeger and Ress, 2002).

Cette technique est utilisée, depuis la fin des années 90, pour étudier le codage spatial des odeurs dans le BO du petit animal (Xu et al., 2000; Yang et al., 1998). Elle permet la cartographie de plusieurs odeurs et, contrairement aux techniques optiques que nous détaillerons plus loin, d'imager la totalité du BO avec une augmentation du signal BOLD de l'ordre de 20%. L'inconvénient majeur de cette technique est qu'il est difficile d'avoir une bonne résolution spatiale et temporelle en même temps (Kida et al., 2002): pour atteindre la résolution glomérulaire les stimulations olfactives appliquées sont très fortes et très longues. Une amélioration de la technique d'acquisition a permis d'effectuer des présentations plus courtes et de détecter l'activation de glomérules ventraux (Martin et al., 2007). Reste que l'IRMf-BOLD est basée sur des indicateurs indirects de l'activité neuronale et que les mécanismes cellulaires responsables de son enclenchement sont encore très mal connus (Heeger & Ress, 2002) et sujet à débat : par exemple l'équipe de N. Logothetis à Tuebingen, qui combine stimulation électrique et enregistrement de signal BOLD chez le singe, privilégie une hypothèse locale sans lien fort avec une activité efférente de la structure visualisée (Logothetis et al., 2001) mais l'équipe de K. Deisseroth à Stanford, qui utilise chez la souris un couplage entre technique optogénétique et BOLD, et pense que les PA efférents peuvent générer également le signal BOLD (Lee et al., 2010).

Imagerie Optique du Signal Intrinsèque (IOSI)

Cette technique utilise en partie une source de contraste liée aux changements d'oxygénation et du volume sanguins mais aussi aux changements des propriétés diffusives des tissus suite à l'activation. L'IOSI est basée sur les changements de réflectance des tissus activés par rapport à leur état de repos. Cette technique a été développée dans les cortex visuel du chat et somatosensoriel du rat (Grinvald et al., 1986; Spors et al., 2002) et appliquée une dizaine d'années plus tard à l'étude du codage spatial des odeurs dans le BO (Rubin and Katz, 1999).

Elle présente l'avantage par rapport au 2DG et au BOLD de pouvoir étudier la carte spatiale pour plusieurs odeurs à plusieurs concentrations chez le même animal avec une résolution spatiale et temporelle plus importante ($<100\ \mu\text{m}$ et $<500\ \text{ms}$). L'instrumentation et la méthodologie de cette technique sont relativement simples. Elles sont décrites en détails dans la partie 'Matériel et méthodes' (partie 2). La carte d'activation est obtenue par comparaison de la réflectance enregistrée pendant la

période de stimulation et celle enregistrée pendant une période de ligne de base, calculée juste avant la stimulation. La soustraction du nombre de photons réfléchis et détectés par la caméra entre les deux périodes permet d'observer une baisse de la réflectance pendant la stimulation due à l'augmentation de l'absorption des photons dans les zones activées. Après calcul, ces zones apparaissent plus sombres que les autres régions sur la carte spatiale.

Les cartes d'activation visualisées par IOSI correspondent bien à des glomérules activés. Comme visualisées sur des coupes anatomiques, ces glomérules sont de taille variable de 50 à 150 μm (Meister & Bonhoeffer., 2001 ; Lin et al., 2006). Les cartes sont symétriques dans les deux hémisphères du BO et relativement reproductibles (Belluscio & Katz, 2001; Meister & Bonhoeffer, 2001; Soucy et al., 2009). La résolution spatiale de cette technique permet l'étude fine des cartes d'activation spatiale (de l'ordre du glomérule) en fonction de la quantité (concentrations) et de la qualité (groupements chimiques fonctionnels) des molécules odorantes (Uchida et al., 2000). Des marquages de la cytochrome oxydase chez le rat ont montré que les zones activées correspondaient à des glomérules (Meister and Bonhoeffer, 2001).

Cependant, l'origine biophysique de ce signal reste débattue. A 630nm, les changements des propriétés de diffusion du tissu nerveux peuvent être dus à la fois aux changements de l'oxygénation de l'hémoglobine et de volume sanguin mais aussi à la biréfringence axonale ou au gonflement cellulaire dû à l'activité (Meister et Bonhoeffer., 2001). Malgré cela, des études pharmacologiques ont permis de comprendre les bases cellulaires du signal intrinsèque. Le blocage de la transmission GABAergique, dopaminergique, glutamatergique, et de la recapture du glutamate ont révélés que seule la libération présynaptique de glutamate et sa recapture par les astrocytes sont des voies indispensables pour l'obtention du signal intrinsèque (Gurden et al., 2006). Ces résultats montrent que les signaux endogènes détectés par l'imagerie optique intrinsèque sont synaptiques et ne dépendent pas de l'activité des PA post-synaptiques (Thomsen et al., 2004). Une étude très récente de l'équipe d'Alan Carleton, montre que ce signal enregistré dans le BO serait dépendant de l'activité des OSN afférents, confirmant une origine présynaptique de ce signal optique (Vincis et al., 2015).

Résultats obtenus sur le codage spatial par les méthodes utilisant des signaux endogènes

Dès les premières études de la représentation spatiale des odeurs dans le BO par imagerie 2DG (Stewart et al., 1979), la théorie selon laquelle chaque odeur a sa propre représentation spatiale a été confirmée. Il existe en fait une certaine chimiotopie dans le BO, c'est à dire une répartition spatiale des réponses dans les glomérules du BO en fonction des groupements chimiques des molécules odorantes. A titre d'exemple, les groupements carboxyliques COOH ou aldéhyde CHO activent la partie antéro-médiane alors que les groupements OH activent le côté latéral sur des cartes de la partie dorsale du BO visualisées en imagerie optique (Uchida et al., 2000). La ségrégation spatiale de l'activation des glomérules a été confirmée peu de temps après sur l'ensemble du BO par imagerie 2DG (Johnson et al., 2002). Cependant ces deux études montrent également que cette chimiotopie n'est pas stricte. Si la définition de zones larges contenant un grand ensemble de glomérules semble juste, à une échelle plus restreinte, la chimiotopie n'est plus respectée car deux glomérules adjacents peuvent répondre à des molécules odorantes totalement différentes dans leur structure chimique (Soucy et al., 2009). Le degré de précision de la chimiotopie et son implication dans la représentation spatiale et la discrimination olfactive restent encore à être déterminées.

Des molécules proches dans leurs structures chimiques et leur longueur de chaînes carbonées activent des cartes relativement similaires (Rubin and Katz, 1999; Uchida et al., 2000), cartes dans lesquelles, conformément aux données obtenues sur les OSN, la représentation combinatoire au niveau des glomérules existe: par exemple la carte spatiale spécifique de l'odeur de sauce de soja partage des glomérules avec celle de l'odeur de vinaigre. Certaines odeurs ont même des cartes spatiales quasi similaires comme l'odeur d'amande grillée avec celle du beurre de cacahuète (Lin et al., 2006). Des cartes très proches dans leur composition mais toutefois distinctes sont également obtenues en réponse à des énantiomères (Stewart et al., 1979). Les énantiomères induisent des cartes d'activation bulbaires très proches mais légèrement différentes. Des études très intéressantes sur les énantiomères ont été publiées par (Linster et al., 2001; Linster et al., 2002) en imagerie 2DG et IOSI par Rubin et Katz (2001). Du point de vue comportemental, les odeurs structurellement proches et qui évoquent des cartes qui se recouvrent sont difficiles à discriminer comparées à des molécules structurellement éloignées. Toutefois, même dans le cas d'une paire d'énantiomères que les rats ne distinguent pas du tout spontanément limonène (Linster et al., 2002), l'apprentissage (qui sollicite l'ensemble des mécanismes de représentation spatiotemporelle des odeurs et une forte activité centrifuge) aboutit à une discrimination efficace de ces odeurs.

En plus, d'être dépendantes des structures chimiques des molécules, la formation des cartes est aussi dépendante des concentrations de l'odorant). Ainsi, pour la même molécule, les cartes d'activation obtenues sont plus étendues si les concentrations sont augmentées (Rubin et Katz, 1999 ; Meister et Bonhoeffer., 2001 ; Grossman et al., 2008). L'augmentation de la durée de stimulation augmente le signal des glomérules faiblement activés et permet l'activation de glomérules

supplémentaires (Bozza et al., 2004). Les variations de flux d'air dans la cavité nasale impactent également la sensibilité glomérulaire et la représentation spatiale des odeurs en fonction des propriétés chimiques de chaque odorant (Oka et al., 2009).

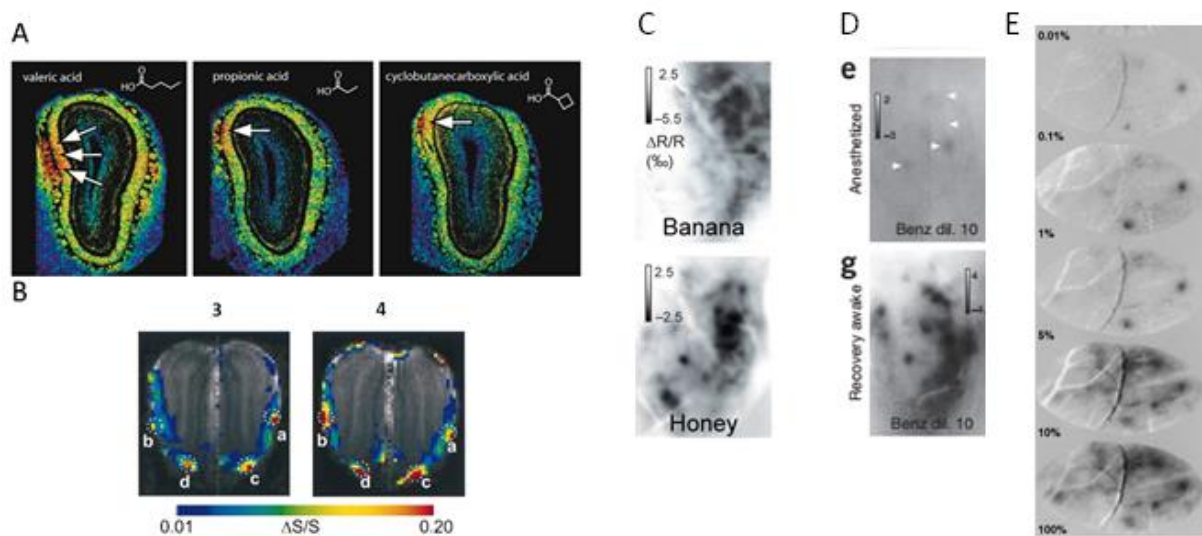


Figure 1.5 Cartes d'activation spatiale du BO visualisées avec différentes techniques se basant sur des signaux endogènes liés au métabolisme énergétique. A) Cartes d'activation obtenues par imagerie 2DG en réponse à trois molécules portant des fonctions acides. Vue anatomofonctionnelle d'un hémibulbe (coupes coronales). B) Cartes d'activation (coupes coronales) obtenues par IRMf chez deux animaux différents (#3 et #4) en réponse à une exposition à l'isoamyl acetate 1% (pression vapeur) durant 4.8 minutes. Notons la reproductibilité des cartes chez les deux animaux. C) Cartes d'activation induites par diverses odeurs naturelles (les images représentant la moyenne de toutes les réponses obtenues au cours de la présentation de l'odeur, obtenues par IOSI (vue dorsale). D) Cartes olfactives en réponse à une odeur de benzaldehyde à 10% chez la souris anesthésiée en haut et chez la même souris éveillée en bas. Notez l'augmentation importante du nombre de glomérules à l'état éveillé. E) Cartes d'activation en réponse à une concentration croissante d'isoamylacétate. Notez l'augmentation du nombre de glomérules qui accompagne l'augmentation de concentration. A. Figure modifiée de Johnson et Leon., 2007. B. modifiée de Yang et al., 1998 C et D. Modifiée de (Vincis et al., 2012). E. Rubin et Katz, 1999.

3.2.1.3 Cartographie par utilisation de traceurs exogènes

Manganese-Enhanced MRI

L'IRM est une technique non invasive qui utilise dans la majorité des enregistrements des protocoles qui détectent le signal des protons des molécules d'eau, composant principal des tissus. Cette approche permet de mettre en évidence la densité des protons et de différencier les états de l'eau au sein des structures biologiques. Selon les séquences d'imagerie utilisées, on accède ainsi à des informations anatomiques ou anatomo-fonctionnelles (renseignant à la fois sur la morphologie, l'état physiologique ou physiopathologique des tissus).

Le manganèse (Mn^{2+}), est un ion paramagnétique, essentiel et vital pour de nombreux processus cellulaires détaillés dans la revue suivante (Santamaria, 2008). Dans le cadre de cette thèse, je me limiterai toutefois à décrire son utilisation dans le cadre de l'imagerie médicale, en tant qu'agent de contraste pour l'IRM. Le Mn^{2+} est considéré comme un agent de contraste « positif » : en diminuant le temps de relaxation longitudinal des protons de l'eau dans les tissus où il est présent, il permet d'en augmenter le signal sur les images pondérées T1 (Lauterbur et al., 1978). C'est un analogue du calcium, qui se substitue à ce dernier dans différentes structures biologiques, notamment les neurones, et permet de mettre en évidence chez les rongeurs et les singes *in vivo*, avec des séquences d'imagerie adaptées, les interconnexions anatomiques et la morphologie de différentes structures cérébrales, de surveiller des zones d'activité neuronales et mesurer l'efficacité du transport axonal (Inoue et al., 2011). Ses propriétés confèrent au Mn^{2+} une neurotoxicité, et il est connu que chez l'Homme une exposition chronique au Mn^{2+} peut provoquer un syndrome neurologique irréversible semblable à la maladie de Parkinson, aussi appelé « manganisme » (Cersosimo & Koller 2006; Santamaria 2008), tandis qu'une exposition aiguë (comme lors d'une injection systémique d'agent de contraste) peut provoquer défaillances cardiaques et hépatiques. Chez les animaux de laboratoire, en particulier les rats et les souris, les quantités optimales permettant d'obtenir un bon contraste tout en limitant les effets secondaires nocifs ont été définies (Silva et al., 2004; Eschenko et al., 2010b), tandis que l'optimisation de la quantité et de la manière de délivrer le Mn^{2+} sont l'objet de recherches constantes (Bock et al., 2008; Eschenko et al., 2010a; Sepúlveda et al., 2012; Grünecker et al., 2013). Dans cette étude, nous avons injecté à nos animaux une solution de 20 μ l (10 μ L par narine) de chlorure de manganèse ($MnCl_2$) de 10 mM dans une solution isotonique au pH physiologique. La voie d'injection intranasale et la concentration faible que nous avons choisie permettent d'atténuer les effets toxiques aigus du Mn^{2+} .

L'utilisation conjointe de l'IRM et de l'injection du Mn^{2+} pour mesurer une augmentation de l'influx calcique en réponse à une activité neuronale a été mise au point à la fin des années 90, par Alan Koretsky et son équipe (Lin and Koretsky, 1997). Une fois le manganèse injecté dans une région spécifique du cerveau, il a la propriété de se déplacer par les voies neuronales appropriées dans la direction antérograde (Pautler et al., 1998a). En se substituant au calcium, il entre principalement dans les cellules excitables par des canaux calciques (de type L, mais aussi par les récepteurs NMDA) et les échangeurs Na^+/Ca^{2+} . Il est ensuite séquestré dans le réticulum endoplasmique et cumulé pour le transport, qui s'effectue à l'aide des microtubules, jusqu'aux synapses où il est libéré et recapturé par les neurones postsynaptiques (Pautler et al., 2003).

Le MEMRI est apparu comme une alternative intéressante au BOLD chez le rongeur puisque son utilisation ne dépend pas des propriétés hémodynamiques des tissus mais de la densité locale de cellules neuronales, de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique ainsi que de l'activité

neuronale (Pautler, 2004; Koretsky, 2012; Silva, 2012). Un autre avantage expérimental du MEMRI est le temps d'absorption du Mn^{2+} , qui permet aux animaux de rester éveillés et libres de leurs mouvements pendant une stimulation, et de réaliser rétrospectivement sous anesthésie l'acquisition des images de l'activité neuronale, sans que l'anesthésie n'impacte l'activité cérébrale (Lin and Koretsky, 1997). Le MEMRI a permis la cartographie de l'activité neuronale évoquée en réponse au son (Yu et al., 2005, 2007), de l'adaptation à la lumière dans les neurones de la rétine (Berkowitz et al., 2006) ou encore les mesures de l'activité neuronale du BO en réponse à une odeur. C'est une technique particulièrement adaptée pour l'étude des différentes modalités sensorielles dans des conditions peu stressantes et proches de la perception naturelle, l'animal étant libre de ses mouvements et dans son échantillonnage des odeurs. Je décrirai par la suite la manière dont le MEMRI a été utilisé pour étudier le système olfactif, en insistant particulièrement sur les études portant sur l'étude fonctionnelle de différentes structures du système olfactif en réponse à une stimulation.

Après qu'il a été montré qu'on pouvait utiliser le MEMRI (Pautler et al., 1998b) pour visualiser des connections neuronales *in vivo* dans le système olfactif et visuel, (Cross et al., 2004) ont utilisé le MEMRI *in vivo* chez le rat pour caractériser les connexions olfactives fonctionnelles et ont montré une accumulation de Mn^{2+} dans le tractus olfactif, le TO et l'amygdale. Cette technique a également été utilisée pour montrer l'effet de l'âge, de lésions ou de maladies sur le cortex olfactif primaire (Cross et al., 2006, 2008). L'équipe d'Alan Koretsky a également réussi à utiliser le MEMRI pour détecter des glomérules individuels, mais seulement en enregistrement anatomique sans stimulation olfactive (Chuang et al., 2010b). D'autres études ont permis de cartographier les réponses cérébrales à une odeur : en stimulant des souris avec des odeurs (odeur d'urine de mâle et amyl acétate), le MEMRI permettait d'observer des cartes d'activation spatiale précises au niveau du BO et de l'AOB (Pautler and Koretsky, 2002). Après injection systémique et ouverture partielle et réversible de la barrière hémato encéphalique, (Fletcher et al., 2009) ont montré une activation de l'amygdale et de l'hypothalamus plus forte lorsqu'un animal est stimulé par une odeur de prédateur que par d'autres odeurs, corroborant les résultats obtenus avec *c-fos* (Dielenberg and McGregor, 2001), malgré un protocole nécessitant une chirurgie lourde, et potentiellement délétère pour les fonctions cérébrales (Aoki et al., 2004). De façon moins traumatique, il est possible de réaliser une injection intranasale de Mn^{2+} . Dans ces conditions, Chuang et al. (2009) et Pautler et Koretsky (2002) ont montré des accumulations différentes de Mn^{2+} dans la couche glomérulaire pour différentes stimulations olfactives mono-moléculaires. Au-delà du BO et de l'AOB, Lehallier et al. (2012) ont utilisé deux odeurs naturelles différentes (fèces de renard et céréales chocolatées) pour stimuler des rats et observer l'activation différentielle de structures corticales olfactives profondes. Soulignons également que même dans les études dont il n'est pas directement l'objet, le système olfactif constitue, de par sa facilité d'accès, une structure idéale pour étudier le transport axonal de Mn^{2+} , qui est souvent ralenti ou

déficient dans le cadre de troubles neurodégénératifs, notamment dans les modèles animaux de taupathies ou de la maladie d'Alzheimer (Smith et al., 2007; Majid et al., 2014). Par ailleurs, cette technique a été utilisée pour suivre la dynamique d'évènements excitotoxiques au sein du BO après l'injection de quinolinate, un agoniste des récepteurs NMDA (Gobbo et al., 2012).

Le tableau I.2. résume les paramètres des enregistrements MEMRI effectués dans le système olfactif. Il aborde les articles principaux de la littérature pour donner une vue globale des approches qui ont été adoptées jusqu'à présent.

1er auteur	date	structures étudiées	souches d'animaux	nombre d'animaux	Concentration de Manganèse	Temps acquisition après mn2 +	durée de l'acquisition (dans le scanner)	FOV	Puissance de l'aimant	matrice (avant processing)	TE et TR (ms)
Pautler et al	2002	BO, EO, AOB	Souris FVB	30	4µl x 39µM in 1mL H2O (1 narine?)	1.5 h	82min	1.5x1,5x1,5 cm	7T	128 x 128 x 128	TE= 9.7 TR= 300
Cross et al	2004	BO, LOT, Tu, PC, Am	Sprague Dawley	6	10µl x 1M (narine droite)	1,6,12,24,36,48,72 heures et 5.5, 7.5, 10.5 et 13,5 jours	7 min 54	7 x 4 cm	1,5T	0.273 x 0.273 x 0.5 mm	TE= 6.8 TR= 15 flip angle= 45°
Chuang et al	2009	BO	souris transgéniques r17 --> M71 (129 x C57BL/6) et C57BL/6	32	7µL de 10mM dans chaque narine	40-60 min	1.5-2.5h	?	11,7T	128 x 128 x 64	TE= 10 TR= 300
Chuang et al	2009	BO,AON, PC, Am, Hpc	Sprague Dawley	8	20 µl de 500mM dans chaque narine	1, 12, 24, 36 et 48 h	?	38,4 x 25,6 x 25,6 mm3	11,7T	192 x 128 x 128	TE= 10 TR= 300
Chuang et al	2010	BO	Sprague Dawley	13	176mg/kg de 120mM	24h	2h20	?	11,7T	256 x 288 x 192	TE= 9.7 TR= 300
Eschenko et al	2010	cerveau entier	Sprague Dawley	18	16 mg/kg/10 ml, 32 mg/kg/10 ml et 80 mg/kg/10 ml en sous-cutané ou 80 mg/kg/10 ml en intraperitonéal	1-14j	?	48 x 48 x 40 mm	7T	192 x 192 x 80	TE= 4 TR= 22,2
Gutman et al	2011	BO, AON, PC, CO, TO, Cant, Nacc,Am	Souris CFW Swiss Webster	6	5µl de 1M dans chaque narine	42h	21 min	1.92 x 1.92 x 1.92 cm3	9,4T	128 x 128 x 128	TE= 4 TR= 70
Lehallier et al	2012	BO, AON,PC, CO,TO,Cant,Am, CE, Hpc	rats brown-Norway	40	3µl de 100mM	4h, 48h	7 min 30	500µm3	4,7T	60 x 60 x 60	TE= 5,5 TR= 500
Bertrand et al	2013	BO	Souris transgéniques JNPL3 (fond c57BL6, DBA/2 et SW)	25	1,5µL de 5M dans une narine	1, 4, 8, 12, 24, 36 et 48 h	15min	19.2 x 19.2 x 9.6 mm	7T	128 x 128 x 64	TE= 4 TR= 15

Tableau 1.2. Paramètres des principaux enregistrements MEMRI dans le système olfactif. Abréviations : BO : Bulbe olfactif ; OE : Epithélium Olfactif ; AOB : Bulbe olfactif accessoire ; LOT : Tractus olfactif latéral ; Tu : Tubercule olfactif ; PC : Cortex Piriforme, Am : amygdale ; AON : noyau olfactif antérieur ; Hpc : Hippocampe ; Cant : Commissure antérieure ; Nacc : noyau accumbens ; CO : Cortex Olfactif ; CE : Cortex entorhinal ;FOV : Field of view (champ de vue) ; TE : Temps d'écho ; TR : Temps de résonance.

Comme indiqué précédemment, un des défauts majeur du MEMRI est l'accumulation intracellulaire de Mn²⁺ qui de fait empêche d'utiliser un animal comme son propre témoin au cours d'une seule expérience MEMRI et nécessite de constituer séparément des groupes d'animaux stimulés

et témoins. De fait, il est nécessaire de disposer d'un nombre d'animaux suffisamment important, pour développer une analyse d'image statistique prenant en compte uniquement l'intensité et la répartition spatiale du Mn^{2+} , tout en atténuant l'influence de la variabilité interindividuelle (incluant la morphologie unique de chaque individu, mais aussi le placement différentiel de chaque animal dans le système d'acquisition) et la variation de paramètres externes à la concentration du Mn^{2+} (Cross et al., 2004). Avant cette publication, beaucoup d'études utilisant le MEMRI limitaient leurs méthodes d'analyse à l'observation individuelle d'animaux ou à l'utilisation de régions d'intérêt (ROI) conventionnelles. Comme j'ai pu le constater personnellement au cours de mes premières analyses, le placement d'une ROI manuelle est sujet à un biais dépendant de l'expérimentateur et il est facile, en choisissant arbitrairement un seuil de détection, de ne pas détecter des variations de Mn^{2+} subtiles mais significatives. La méthode d'analyse développée doit donc être idéalement indépendante de l'utilisateur et permettre de comparer des images sans régions d'intérêt prédéfinies.

Chez l'Homme, des techniques combinant normalisation stéréotaxique et anatomique et analyses statistiques, regroupées sous la dénomination SPM (pour Statistical Parametric Mapping) ont été développées et appliquées depuis deux décennies dans le cadre d'études cliniques utilisant le PET (Friston et al., 1989; Minoshima et al., 1994) ou l'IRM (Friston et al., 1995). A ma connaissance, (Leergaard et al., 2003) ont publié la première étude combinant normalisation anatomique en trois dimensions et MEMRI chez le petit animal et ont mis en évidence de façon efficace la connectivité entre différentes régions du cortex somatosensoriel chez le rat. Toutefois, ce n'est qu'en 2004 que (Cross et al., 2004) ont associé normalisation en trois dimensions et analyse statistique pour étudier la connectivité entre différentes structures du système olfactif. Plus récemment, ces techniques ont été utilisées principalement en association avec une IRM classique pour mettre en évidence des changements anatomiques chez des modèles animaux présentant des troubles neurologiques (autisme, maladie de Huntington, maladie d'Alzheimer) (Lau et al., 2008; Sawiak et al., 2009, 2013, 2014; Ellegood et al., 2013). Ces approches ne combinent encore que très rarement MEMRI, SPM et étude fonctionnelle de cortex sensoriels. (Yu et al., 2008) ont publié une méthode de SPM basée sur l'acquisition MEMRI chez la souris pour étudier des patterns d'activité en réponse à des stimuli auditifs et produisant des cartes statistiques tridimensionnelles représentative de l'activité fonctionnelle du cortex auditif et ont montré que le volume de ces cartes augmentait proportionnellement à l'intensité du stimulus auditif. Une solution pour automatiser les étapes de normalisation spatiale et améliorer le choix des régions de référence pour obtenir une normalisation d'intensité plus efficace des images acquises au cours du MEMRI ont été proposées (Lehallier et al., 2011) et utilisées dans le cadre d'une étude chez le rat comparant marquage c-fos et MEMRI dans l'ensemble des structures olfactives centrales suite à la présentation d'odeurs biologiquement significatives (Lehallier et al., 2012).

Je présenterai en détails la technique d'analyse SPM que nous avons adaptée à nos signaux de MEMRI dans la partie 2, 'méthodes expérimentales'.

3.2.1.4 Techniques optiques

En dépit de la bonne résolution spatiale de l'IOSI, sa résolution temporelle reste largement insuffisante pour étudier la dynamique du codage spatial des odeurs. En effet, des études comportementales suggèrent que dans le cadre d'une tâche de Go/NoGo, les odeurs sont discriminées dans un délai de 200 à 300 ms selon la complexité des odeurs utilisées (Abraham et al., 2004; Uchida & Mainen, 2003). La réponse des glomérules à l'odeur doit donc s'effectuer dans un laps de temps très court, autour de 100ms. Le couplage neuro-énergétique sur lequel se base les méthodes décrites précédemment est plus lent que l'activité synaptique qui l'induit. La nécessité de suivre en temps réel la mise en place de la carte spatiale dans le BO a mené à l'utilisation de techniques qui permettent d'avoir une résolution spatiale équivalente à l'IOSI mais avec une meilleure résolution temporelle. Pour l'étude des cartes spatiales dans le BO, des marqueurs fluorophores exogènes de l'activité neuronale ont donc été utilisés afin de suivre la mise en place des cartes d'activation au cours du temps chez le rongeur anesthésié mais aussi chez l'animal vigile restreint de ses mouvements.

Cartographie par utilisation de sondes sensibles au voltage (VSDI)

Cette technique est basée sur l'incorporation par les membranes cellulaires de sondes fluorescentes voltage-dépendantes. Ces sondes sont sensibles aux variations du voltage membranaire et présentent une augmentation de fluorescence de manière linéaire avec les changements de voltage de la membrane. La fluorescence augmente en quelques millisecondes, ce qui est inférieur au temps nécessaire à l'élaboration d'un PA. Ceci donne une excellente résolution temporelle rendant compte de l'activité neuronale locale en temps réel (Pain et al., 2011).

Cette technique a été longtemps écartée car elle présentait de nombreux inconvénients, le plus important étant le faible rapport signal/bruit. Ce défaut était dû aux nombreuses liaisons non spécifiques des molécules chimiques développées, et à l'absorption par l'hémoglobine des photons de fluorescence émis. L'avènement de nouvelles sondes fluorescentes avec des longueurs d'ondes d'excitation en dehors du pic d'absorption de l'hémoglobine a constitué une grande avancée dans le domaine. Des sondes plus spécifiques améliorent le contraste signal sur bruit, ce qui évite de moyenniser des nombreuses acquisitions avec des temps d'exposition relativement longs et

potentiellement toxiques pour le tissu. Le développement de caméras de plus en plus performantes a rendu cette technique très appropriée pour suivre le décours temporel de l'activation des cartes spatiales. Les cartes spatiales obtenues en VSDI sont comparables avec l'IOSI mais l'activation y est visualisée sept fois plus rapidement (Spors and Grinvald, 2002).

Cartographie par utilisation de sondes calciques exogènes

L'activité synaptique est fortement liée aux flux calciques. Ces ions ont donc été utilisés pour suivre l'activité cérébrale, grâce à des sondes calciques fluorescentes couplées à l'imagerie optique. Les traceurs calciques utilisés sont incorporés par les cellules et stockés dans le cytoplasme. Les marqueurs calciques peuvent être exogènes, ou endogènes chez des souris transgéniques.

Des marqueurs exogènes présynaptiques (calcium green oregon) ont été développés et utilisés chez la souris (Wachowiak & Cohen, 2001). La sonde est instillée dans la narine avec un perméabilisant de membranes (0,1% Triton x 100), pénètre dans les OSN puis est transportée de manière antérograde vers les terminaisons axonales glomérulaires. Cette technique permet de cartographier l'activation du BO par imagerie des OSN activés par l'odorant. Bien que les seuils d'activation soient les mêmes pour les techniques d'IOSI et d'imagerie calcique, il faut 1,5s pour atteindre la ½ du maximum d'activation pour les signaux IOSI, là où 100-250 ms sont suffisantes pour l'imagerie calcique (Wachowiak & Cohen, 2003). La haute résolution temporelle de cette technique a permis d'étudier le décours temporel des représentations spatiales des odeurs chez des animaux anesthésiés et vigiles (Verhagen et al., 2007; Wachowiak & Cohen, 2003) (figure I.7). Ceci a permis de déterminer des corrélations entre l'activité de flairage et le décours temporel de l'activation spatiale dans le BO avec la détection de zones activées qui sont plus focales que celles détectées en IOSI (85 vs 122 µm de diamètre). Cette technique présente cependant quelques inconvénients. En effet, 4 jours sont nécessaires entre l'instillation de la sonde dans les narines et l'imagerie. Ce temps est dû au transport des sondes vers les extrémités axonales (Fried et al., 2002; Wachowiak & Cohen, 2003).

Les odeurs peuvent emprunter la voie orthonasale pour accéder directement à la cavité nasale, mais aussi la voie rétronasale, lorsqu'elles sont dans la voie buccale. L'imagerie calcique a été utilisée pour déterminer la manière dont la voie d'entrée des odeurs modifiait la représentation spatiotemporelle d'une même odeur au sein du BO chez le rat (Gautam and Verhagen, 2012). La haute résolution temporelle de cette technique a permis d'étudier les terminaisons présynaptiques glomérulaires et leur dynamique temporelle. Si l'activité spatiale et la dynamique temporelle des cartes olfactives engendrées par une odeur demeure similaire quelle que soit la voie d'entrée, la voie rétronasale induit une amplitude de réponse plus faible qui est dépendante de la volatilité de l'odeur et

une dynamique temporelle des cartes spatiales légèrement ralentie. Cependant l'enregistrement rétronasal des cartes est moins variable que lors d'une présentation orthonasale, en fonction de la polarité de l'odeur présentée. Cette étude a également été effectuée en utilisant un marqueur fluorescent génétique (voir plus loin dans ce chapitre).

3.2.1.5 Cartographie par utilisation de souches d'animaux transgéniques

Une alternative intéressante à l'injection de sondes fluorescente exogène dans le BO a été d'utiliser des souris transgéniques avec des marqueurs d'activité calcique fluorescents produits de façon endogène par les souris. Deux souches d'animaux transgéniques permettant la visualisation de l'activité neuronale ont été développées. Une première souche (SpH) permet de voir l'activité de libération de neurotransmetteurs au niveau présynaptique alors qu'une autre (GCaMP2) permet d'observer l'activité post-synaptique. Le rapport signal sur bruit dû à ces deux marqueurs est comparable à celui de l'imagerie calcique exogène (Bozza et al., 2004).

Cartographie de la libération des vésicules présynaptiques des OSN par utilisation de SpH

En 2004, Bozza et al. ont proposé l'usage de la SpH (Synapto-pHluorine) pour marquer les OSN. Cette protéine contient un fluorophore sensible au pH et la protéine associée aux vésicules synaptiques VAMP-2. Le domaine fluorescent est situé du côté de la vésicule où le pH est acide où la fluorescence est faible. Lors de l'activation, les vésicules synaptiques s'associent à la membrane plasmique de la cellule et la protéine se retrouve dans la fente synaptique extracellulaire à pH plus élevé, ce qui induit l'augmentation de la fluorescence.

Cette protéine a été utilisée comme marqueur d'activité des OSN en couplant son expression à celle d'une protéine présente uniquement dans ces neurones : l'OMP (pour Olfactory Marker Protein). Chez ces souris, une fluorescence basale due à la présence de SpH dans les membranes plasmiques des terminaisons axonales des OSN est observée dans les glomérules : cette fluorescence a été décrite comme étant variable entre les glomérules de par la variabilité de l'expression des OMP dans les OSN. Cette technique permet d'avoir une meilleure amplitude de signal et une meilleure résolution spatiale que celle obtenue par IOSI : les cartes obtenues chez les souris SpH montrent des changements relatifs des signaux d'environ 4% (Soucy et al., 2009) de 10 à 20 fois supérieurs à l'amplitude observée en IOSI (Wachowiak et al., 2005). Les cartes établies sont spécifiques de chaque odeur mais contrairement aux autres techniques d'imagerie optique, la saturation du signal est plus difficile à

atteindre (Bozza et al., 2004). Des différences de résultats sont observées avec les marqueurs présynaptiques de colorants calciques, différences dues probablement au type de marqueur, exogène versus endogène génétiquement modifié. Enfin, en plus du photoblanchiment, une partie de ce signal est absorbée par l'activité hémodynamique. Les temps de récupération lents ne permettent pas l'étude fine de la dynamique temporelle des cartes d'activation (Bozza et al., 2004).

Cette technique a aussi été utilisée dans le cadre de l'étude de l'activation différentielle du BO par les voies rétronasales et orthonasales (Furudono et al., 2013). Si elle ne permet pas d'étudier la dynamique temporelle de l'activation glomérulaire, elle permet toutefois d'étudier précisément l'effet de différents paramètres du stimulus olfactif (concentration, pression de l'air, variation de la structure chimique) sur la dynamique d'activation spatiale. Si cette étude confirme certains des résultats obtenus en imagerie calcique que j'ai décrits dans le paragraphe précédent (Gautam et Verhagen, 2012), elle montre que le seuil de détection requis pour induire une carte d'activation spatiale dans le BO est plus important lorsque les odeurs sont présentées par la voie rétronasale. Ceci implique que si les cartes spatiales sont bien similaires au-dessus du seuil de détection pour les deux voies, elles diffèrent lorsque les odeurs délivrées sont proches du seuil de détection. Les réponses orthonasales semblent plus sensibles aux variations chimiques de la structure de l'odeur délivrée, et induisent moins d'activité lors de la présentation de molécules hydrophobes par exemple.

Récemment, (Kass et al., 2013) ont utilisé cette technique SpH pour comparer la plasticité des cartes d'activité présynaptique dans le glomérule avant et après l'apprentissage d'une tâche de peur conditionnée (ou fear conditioning). Au cours de cette tâche, les animaux apprennent qu'un stimulus sensoriel neutre (ici une odeur CS+) prédit l'occurrence d'un stimulus aversif (ici un choc électrique), lequel peut en retour altérer le traitement du stimulus neutre. Une autre odeur (CS-) est présentée sans autre stimulus associé. Après conditionnement, les signaux SpH induits par les odeurs CS+ associées au choc augmentent fortement en intensité et en magnitude, ce qui n'est pas le cas pour les autres odeurs. Par ailleurs, seuls les glomérules spécifiquement activés par CS+ montrent une activation accrue. De manière intéressante, les odeurs CS+ et CS- sont toutes deux des esters, et induisaient l'activation commune de certains glomérules. L'utilisation de SpH a permis de montrer qu'après apprentissage de la tâche, l'activation de ces glomérules communs était augmentée spécifiquement au niveau des projections des OSN stimulés par CS+. Lors d'une stimulation par CS-, il n'y avait pas plus d'activation dans ces glomérules qu'avant l'apprentissage. Les auteurs ont montré que la tâche de peur conditionnée modifiait également le seuil d'activation de ces glomérules, et que pour obtenir une activité similaire à celle observée après conditionnement, la concentration d'odorant CS+ devait être quadruplée chez un animal non conditionné. Cette étude montre qu'une information émotionnelle concernant un stimulus olfactif peut être encodée très précocement, au niveau des OSN et dès l'entrée

dans le BO. Cette étude rejoint également ma conclusion sur la plasticité très intéressante de la MO qui est l'objet d'étude intense actuellement.

Cartographie par imagerie de l'activation postsynaptique par utilisation de GCaMP2

Ce type d'imagerie est rendu possible grâce à l'utilisation d'une souche de souris exprimant la GCaMP2, indicateur fluorescent de calcium, dans le compartiment postsynaptique. L'expression du gène est sous le contrôle du promoteur d'un canal potassique postsynaptique (KV3.1). Cette technique permet de voir des cartes d'activations avec des variations de signal allant de 4-6 % (Fletcher et al., 2009). L'expression de la GCaMP2 a été caractérisée dans les cellules postsynaptiques : les M/TC et JC. Elle permet de voir un signal diffus sur lequel se superposent des spots très focaux (67 µm de diamètre en moyenne). La résolution spatiale des points focaux est correcte mais la résolution temporelle est inférieure à celles du signal VSD postsynaptique, ou calcique présynaptique, ce qui ne donne pas accès à la dynamique temporelle de la mise en place des cartes spatiales. Le blocage de la signalisation glutamatergique supprime le signal induit par stimulation électriques de l'ONL, confirmant l'origine post synaptique du signal (Fletcher et al., 2009). Cependant l'imagerie par GCaMP2 est limitée aux trois premiers mois de la vie de la souris puisque l'expression s'affaiblit et le rapport signal/bruit diminue. L'arrivée sur le marché de nouveaux indicateurs de fort rapport signal/bruit comme GCaMP5 (Wachowiak et al., 2013) et GCaMP6 permettra de nouvelles études de la cartographie postsynaptique de l'activité glomérulaire dans le BO. Dans une tâche de peur conditionnée similaire à celle utilisée par Kass et al. (2013) qui utilisait la fluorescence SpH, Fletcher a montré en utilisant la GCaMP2 marquant les M/TC que les cartes spatiales ne variaient pas en nombre de glomérules mais en intensité, avec les glomérules faiblement activés avant association odeur-choc qui sont beaucoup plus activés après.

Précédemment, nous avons précisé que les odeurs naturelles n'étaient pas des odorants purs mais des mélanges de molécules diverses avec différents groupements chimiques et a des concentrations différentes. L'étude des cartes d'activations pour une odeur pure ne suffit donc pas à rendre compte du codage spatial des odeurs naturelles. Une combinaison dans un mélange d'odorants purs a d'abord été étudiée par Belluscio et Katz (2001) : ils sont arrivés à la conclusion que la résultante spatiale d'une combinaison d'odorants était l'addition des deux cartes spatiales des odorants purs isolés (Belluscio & Katz, 2001). Cette étude a utilisé des odorants proches : avec la même fonction aldéhyde et avec une différence d'un seul carbone (propanal et butanal 1% de pression de vapeur). Dans la nature, les concentrations de ces molécules ne sont pas équivalentes. Si les concentrations des odorants constituant un mélange sont différentes, la carte spatiale est une addition des glomérules activés par les odorants isolés, avec une prédominance de la carte spatiale du

composant le plus concentré dans le mélange (Grossman et al., 2008). Ce mélange reste également loin des odeurs naturelles : les odorants utilisés ont également les mêmes fonctions chimiques et sont peu nombreux (seulement 2) comparé aux odeurs naturelles.

L'étude des cartes spatiales induites par des odeurs naturelles a fait l'objet d'une étude très intéressante qui a établi une cartographie d'odeurs naturelles au niveau dorsal du BO. Dans cette étude menée en 2006, Lin et collaborateurs ont obtenu des cartes d'activation pour des épices, des amandes grillées, du beurre de cacahuète ainsi que du café et d'autres odeurs naturelles. Ils ont montré que ces odeurs naturelles avaient, de même que les odeurs pures, des cartographies spécifiques et reproductibles globalement d'un animal à l'autre. Grâce à une chromatographie en phase gazeuse, ils ont pu séparer les molécules odorantes des odeurs naturelles et établir que la carte spatiale des odeurs naturelles était l'addition des cartes spatiales des différentes molécules qui la composent (figure I.6.E).

Enfin, il est à noter que toutes les modifications des cartes spatiales que nous avons décrites dans cette section pourraient impliquer une forte composante d'interactions entre glomérules. Il pourrait exister un mécanisme d'inhibition centre-pourtour où le glomérule le plus activé (par les OSN les plus affins pour la molécule odorante présentée) inhibe les autres glomérules. Après une controverse forte entre Vucinic et al. (2006) et Pérez et Wachowiak (2008) qui ont visualisé l'activation des terminaisons axonales des OSN par imagerie calcique, il semble qu'au niveau glomérulaire ces interactions ne soient pas fortement présentes et que la carte spatiale visualisée corresponde bien au panel des OSN activés. Seules des modulations intraglomérulaires puissantes par les multiples interactions OSN-JC-M/TC seraient impliquées pour fixer finalement l'intensité de l'activation.

3.2.1.6 Dynamique temporelle des cartes spatiales

Les techniques d'imagerie optique à haute résolution temporelle ont permis d'observer une dynamique temporelle dans l'établissement des cartes d'activation spatiales. En imagerie VSD, une oscillation à 2Hz correspondant au rythme respiratoire a été observée, suggérant une modulation des cartes d'activation par celle-ci : pendant les 40 premières millisecondes, les cartes d'activation pour une même odeur à différentes concentrations sont les mêmes. Ceci indique que le pattern précoce de la représentation spatiale ne change pas et que les glomérules additionnels pour les plus fortes concentrations s'activent tardivement (Spors and Grinvald, 2002). L'imagerie calcique exogène a montré qu'il y avait un décalage temporel de l'activation à l'échelle d'un seul glomérule (Spors et al. , 2006 ; Wachowiak et al., 2005). Ces observations de la dynamique temporelle du codage spatial a

induit une étude des effets du flairage sur les cartes d'activation spatiales (Spors et al., 2006 ; Verhagen et al., 2007).

Une étude du groupe de Matt Wachowiak a permis de visualiser pour la première fois avec précision le devenir des cartes spatiales chez des rattes restreintes de leur mouvement et engagées dans une tâche de lick-no lick (Verhagen et al., 2007 ; Carey et al., 2009) (figure 1.6.A). Les cartes sont globalement les mêmes dans leur nature : il n'y a pas disparition ou apparition de glomérules avec l'apprentissage mais les dynamiques temporelles de leur apparition sont fortement régulées par le flairage : le passage d'une basse fréquence à une haute fréquence d'inspiration réduit fortement le signal en réponse à une odeur donnée. Si une odeur nouvelle est présentée durant le même cycle respiratoire de flairage, la carte résultante est une différence des glomérules activés entre les deux odeurs, et non pas une addition passive comme auraient pu le laisser penser les études effectuées chez l'animal anesthésié (figure I.6). Le flairage constitue donc un filtre adaptatif qui permet de rendre plus saillant une nouvelle odeur par rapport aux odeurs présentes dans l'environnement de l'animal. Les animaux peuvent adapter à la fois la fréquence et le flux d'air inspiré, et une étude a montré que l'activité du BO visualisée en imagerie VSDI (activité postsynaptique) pouvait être modulée différemment par chacun de ces paramètres (Esclassan et al., 2012).

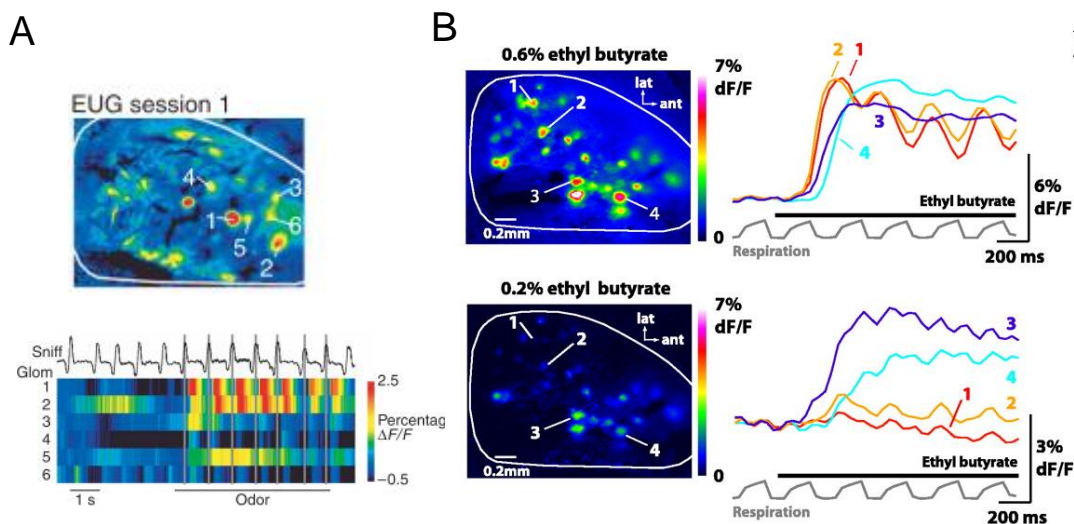


Figure 1.6 Dynamique temporelle des cartes d'activation visualisée par imagerie calcique des OSN. **A. En haut : carte d'activation** en réponse à l'eugénol (6 glomérules détectés) chez l'animal éveillé restreint de ses mouvements. En bas : décours temporel de l'activation des différents glomérules : chaque glomérule a son temps de latence et l'intensité de son activation varie pendant la durée de la stimulation odorante. Notez les différences d'activation du glomérule au sein de chaque cycle respiratoire. **B. A gauche : cartes d'activations** induites par l'ethyl butyrate à 0,2 et 0,6 % chez la souris anesthésiée et trachéotomisée. A droite : les décours temporels d'activation des quatre glomérules. Notons les différences d'intensité d'activation présentée par un même glomérule (1 ou 2) notamment pendant la forte stimulation. A. Figure adaptée de Verhagen et al., 2007. B. Adaptée de Spors et al., 2006.

Il existe une dynamique temporelle intra et inter glomérulaire, une dynamique générale de la carte spatiale en fonction de la fréquence respiratoire mais aussi en fonction de l'état d'éveil et de l'apprentissage. Cependant, ces études par imagerie sur une dimension temporelle de la représentation des odeurs n'en sont qu'à leur début et restent nettement moins étudiées que la représentation temporelle des odeurs par les techniques électrophysiologiques, utilisées depuis les années 1940 dans le domaine de l'olfaction. Cependant, elles montrent clairement le continuum de l'activité répartie dans l'espace glomérulaire suivant des dimensions spatiales et temporelles et les dynamiques temporelles dans les couches profondes du BO.

L'échantillonnage de l'information se fait à l'aide de systèmes sensorimoteurs dédiés. En ce qui concerne l'olfaction, le flairage (ou « sniffing ») permet un échantillonnage rythmique de l'environnement et le contrôle de l'intensité et de la temporalité des afférences sensorielles des structures olfactives. La nature dynamique du flairage, sa fréquence et son flux impliquent qu'il joue un rôle important sur la façon dont est traitée l'information olfactive. L'épithélium olfactif est en effet activé à la fois par des rythmes de flairages innés et imposés (Scott, 2006). De fait, la modification des paramètres du flairage modifie l'adsorption de molécules par l'épithélium olfactif et son activité. Ainsi, pendant la discrimination d'une odeur, un animal pourrait adapter son flairage pour optimiser la quantité de molécules odorantes détectées par les zones adaptées de l'épithélium olfactif (Schoenfeld and Cleland, 2005), et donc tenir compte des propriétés physico chimiques des molécules odorantes rencontrées (notamment leur solubilité et leur volatilité) (Rojas-Libano and Kay, 2012). Toutefois, une étude récente a montré que durant une tâche de discrimination alternative à deux choix, des molécules aux propriétés d'adsorption similaires n'étaient pas systématiquement flairées de la même façon, et qu'une même odeur pouvait être flairée différemment en fonction de la paire d'odeur dans laquelle elle était présentée (Courtiol et al., 2014).

3.3. Le codage temporel dans le BO

Les oscillations du LFP (Local Field Potential, ou potentiel de champ local) dans le système olfactif ont été décrites par Edgar Douglas Adrian, qui a observé pour la première fois ce type d'activité dans le système olfactif du hérisson, en 1942 (Adrian, 1942). Alors, dans l'incapacité de mesurer directement le signal électrique des OSN, trop court et peu intense pour la résolution des enregistrements de l'époque, le chercheur enregistra l'activité des couches profondes du BO. L'anesthésie profonde sous pentobarbital supprima les décharges spontanées, et il put enregistrer des oscillations dont la fréquence variait lorsque des odeurs étaient présentées à l'animal. Ces expériences constituent le fondement de la compréhension de la représentation temporelle des odeurs dans le BO,

et ont par la suite conduit la communauté scientifique à étudier les fonctions et les mécanismes à l'origine des oscillations du LFP. Je décrirai d'abord les mécanismes cellulaires à l'origine de ces oscillations, dans un cadre global, la manière dont elles pourraient façonner la synchronisation neuronale et le codage temporel, et décrirai ensuite plus précisément les différents rythmes puis les profils oscillatoires que l'on peut enregistrer chez l'animal éveillé et anesthésié au sein du BO.

3.3.1. Bases biophysiques générales des LFP

En plaçant une électrode à proximité du milieu extracellulaire cérébral, on peut mesurer la différence de potentiel électrique (ΔV_e) en microvolt par rapport à une référence. C'est ce potentiel électrique que l'on mesure avec les techniques électrophysiologiques extracellulaires, et qui permet d'interpréter de nombreuses facettes de la communication neuronale. Historiquement, le V_e est désigné électroencéphalogramme (EEG) lorsqu'il est enregistré à partir du cuir chevelu, électrocorticogramme (ECoG) quand il est enregistré à partir d'électrodes sous-durales à la surface corticales, et LFP (également appelé micro EGG) quand il est enregistré à l'aide d'électrodes intracérébrales. Il s'agit donc d'un abus de langage de désigner systématiquement le potentiel électrique V_e sous le terme de LFP (Buzsáki et al., 2012), mais par convention, je le nommerai moi-même ainsi dans la suite du manuscrit.

L'origine des aspects extracellulaires de l'activité cérébrale a fait l'objet d'excellentes revues (Logothetis, 2003; Buzsáki et al., 2012). Au cours des paragraphes suivants, j'exposerai de manière synthétique les origines du potentiel électrique mesuré dans le milieu extracellulaire.

La valeur du potentiel électrique mesuré dépend de la contribution des différentes charges présentes dans l'environnement d'une électrode. Au sein du tissu cérébral, le fonctionnement des neurones entraîne des modifications de conductances provoquant des mouvements ioniques sortants ou entrants dans le neurone. L'ensemble des mouvements ioniques transmembranaires dans un volume de tissu cérébral donné génère donc un potentiel électrique extracellulaire V_e par rapport à un potentiel de référence (Bishop & O'Leary, 1942). L'ensemble de ces courants transmembranaires façonnent de manière plus ou moins importantes la forme et les caractéristiques du LFP (telles que son amplitude et sa fréquence) et je décrirai ici une partie de leurs origines.

L'activité synaptique est souvent considérée comme la principale source de courant transmembranaire. L'activation des récepteurs ionotropiques AMPA ou NMDA entraîne une augmentation de la conductance du Na^+ ou du Ca^{2+} , se traduisant par un courant entrant. Ce courant donne naissance à des potentiels post-synaptiques excitateurs (Excitatory Post-Synaptic Potential,

EPSP), qui en s'additionnant peuvent amener le potentiel de membrane de la cellule au seuil de déclenchement d'un PA. Afin de maintenir l'électro-neutralité, un courant passif sortant s'oppose au courant entrant, formant ainsi une boucle électrique. La participation des différents courants synaptiques au potentiel électrique extracellulaire dépend de la nature du composé ionique engagé. Par exemple, les courants inhibiteurs initiés par l'activation des récepteurs GABA contribuent peu au potentiel électrique extracellulaire, étant donné que l'ion Cl^- a un potentiel proche du potentiel de repos et le courant chlore est donc faible (Bartos et al., 2007). Néanmoins lorsque la cellule est très dépolarisée, suite par exemple à l'émission d'un train prolongé de PA, le potentiel de membrane s'éloigne du potentiel du chlore, le courant devient alors plus important tout comme sa contribution au V_e (Trevelyan, 2009).

Les courants synaptiques ne sont pas les seuls acteurs du potentiel extracellulaire. Les PA calciques, supportés par les courants calciques, durent plus longtemps et ont une amplitude élevée (jusqu'à 50 mV). Ils pourraient donc participer de manière substantielle au potentiel extracellulaire (Schiller et al., 1997).

3.3.2. Relations générales entre LFP, potentiel d'action et courants synaptiques

Ce rapide aperçu regroupe les différents événements cellulaires contribuant au potentiel extracellulaire. Le signal LFP étant populationnel, des caractéristiques particulières doivent être prises en compte dans son évaluation en supplément des différentes sources des courants transmembranaires. Il serait trop long de tout relever ici, mais dans sa revue, (Buzsáki et al., 2012) mentionne les différents types d'enregistrement utilisés, la forme des cellules, qui peuvent générer de forts dipôles (comme dans le cas des cellules pyramidales), mais aussi la synchronicité temporelle des événements dipolaires générés ou encore l'alignement spatial des neurones. En fonction de la cytoarchitecture et du type d'enregistrement, le signal LFP proviendra en majorité du compartiment pré- (Logothetis, 2003) mais également postsynaptique (Buzsáki et al., 2012). En effet, les PA (post-synaptiques) sont des événements très rapides, contrairement par exemple aux EPSP qui durent plusieurs millisecondes (Logothetis, 2002). Toutefois, une forte synchronisation rythmique des PA à des fréquences plus basses se traduirait sous forme d'oscillations dans le LFP (Logothetis, 2002). Celui-ci refléterait donc l'activité postsynaptique de la structure d'intérêt. Ces caractéristiques pourraient déterminer l'origine des fréquences du signal oscillatoire qui est un point important dans l'interprétation des oscillations. Par exemple, une augmentation de puissance dans une gamme de fréquence oscillatoire donnée peut être interprétée comme l'augmentation de l'entrée synaptique de la structure, ou bien comme une plus

haute fréquence et/ou synchronie des PA le long des projections centripètes (la « sortie ») de cette même structure. Dans la partie suivante je décrirai le lien entre ces activités et les oscillations du LFP.

La réalisation d'enregistrements EEG pour observer les rythmes cérébraux chez l'Homme a permis à Hans Berger d'identifier des oscillations de basses et hautes fréquences réparties en différentes bandes distinguables par leur association avec un état comportemental particulier, ce qui a été confirmé depuis par un grand nombre d'études (Uhlhaas and Singer, 2010). Les ondes de basse fréquence, les ondes thêta (4-7 Hz) sont par exemple classiquement associées à la navigation spatiale en lien avec l'hippocampe, tandis que les ondes alpha (8-12 Hz), les premières à avoir été découverte par Hans Berger, sont spécifiques de l'état de repos éveillé, yeux fermés. Les ondes de plus hautes fréquences bêta (12-30 Hz) et gamma (supérieures à 30 Hz) sont retrouvées lors des phases d'éveil et sont liés à des processus cognitifs complexes, par exemple attentionnels ou mnésiques (Uhlhaas and Singer, 2010).

3.3.3. Fonction générale des oscillations

Le fait que l'on puisse enregistrer des oscillations à partir d'un signal populationnel indique qu'une part significative des activités sous-jacentes au voisinage de l'électrode est synchronisée. Une oscillation de fréquence et de puissance données émerge lorsque des événements cellulaires apparaissent de manière régulière et rythmique. Même si la fréquence précise des oscillations associées à l'état comportemental dépend de l'organisme et des conditions expérimentales, les activités oscillatoires sont le reflet des interactions excitatrices et inhibitrices prenant place au sein des réseaux neuronaux (Singer, 1993). Par exemple, le fait que l'amplitude des activités oscillatoires diminue avec la fréquence indique qu'un nombre plus faible de neurones participe à l'assemblée neuronale, signant un traitement plus local de l'information (Kopell et al., 2000). L'amplitude et la fréquence du signal LFP dépendent ainsi du niveau de contribution de l'ensemble des sources que j'ai évoquées dans les paragraphes précédents. Une oscillation ample représente ainsi une assemblée cellulaire mieux coordonnée au voisinage de l'électrode, tandis qu'une diminution de l'amplitude serait liée à une diminution du nombre des cellules dans l'assemblée, ou à une plus faible synchronisation.

La synchronisation des activités de décharge des neurones d'un même ensemble réclame la présence d'une référence, d'une base de temps commune (Laurent, 1997). Cette base de temps pourrait être supportée par les activités oscillatoires au sein de l'assemblée. La synchronisation cellulaire émerge le plus souvent des interactions excitatrices et inhibitrices au sein du réseau (Singer, 1993b). L'enregistrement simultané de l'activité multiunitaire et du potentiel de champ local montre

que les neurones déchargent le plus souvent avec un rythme oscillatoire en phase avec les oscillations du potentiel de champ (Singer, 2009). La relation entre l'activité unitaire et le rythme oscillatoire gamma a été étudiée sur tranches de BO de rats par le groupe de Pierre-Marie Lledo. Les auteurs montrent, en couplant des enregistrements intracellulaires, de l'activité multiunitaire et du LFP, que les oscillations du potentiel de membrane et l'émission des PA étaient en phase avec les oscillations du LFP (Lagier et al., 2004). De nombreuses études dans de multiples structures cérébrales ont mis en évidence une corrélation entre cette relation des PA aux oscillations du LFP, et le comportement de l'animal, que ce soit dans le cortex pariétal (Pesaran et al., 2002) et le cortex auditif du macaque (Brosch et al., 2002), ou le l'hippocampe du rat (Csicsvari et al., 2003).

3.3.4. Définition des oscillations du LFP dans le BO

J'ai longuement décrit la représentation chimiotopique dans le BO, avec un ou plusieurs glomérules activés selon la molécule odorante perçue, et dont la localisation dépend des différents paramètres perçus. Toutefois, la représentation des odeurs est également soumise à une puissante dynamique temporelle.

Plus que tout autre système sensoriel, le système olfactif a très tôt été caractérisé par sa forte activité oscillatoire (Freeman and Schneider, 1982). Cette spécificité est probablement due à deux paramètres, la nature du stimulus et l'organisation des aires olfactives. En premier lieu, les molécules odorantes atteignent leur détecteurs bien plus lentement que ne le font le son ou la lumière. La vitesse de détection dépend du flux d'air qui traverse la cavité nasale, et les odeurs n'atteignent pas simultanément les différentes parties de cette dernière. Puisque le stimulus olfactif n'atteint pas tous les récepteurs simultanément, il échoue souvent à déclencher un potentiel évoqué. Ensuite, comme je l'ai décrit précédemment dans le chapitre, les différents relais olfactifs centraux (BO et PC) sont étroitement interconnectés et possèdent certaines caractéristiques spécifiques : les synapses dendrodentritiques des MC et GC dans le BO, et un réseau dense de fibres associatives dans le PC. Les synapses réciproques entre CG et MT jouent un rôle central dans la large activité oscillatoire existante dans le système olfactif.

Les activités oscillatoires dans le système olfactif couvrent une large bande de fréquence comprise entre 1 et 150 Hz. Dans le BO et le PC, il existe principalement trois rythmes différents (Martin et Ravel, 2014). Le plus large et le plus évident est lié à la respiration et survient dans une gamme de fréquence se superposant à celle du rythme theta hippocampique (environ 1-10 Hz) (Kay et al., 2009). Chez des animaux éveillés et motivés, des bouffées régulières d'oscillations rapides, le

rythme gamma (60-90 Hz), apparaissent à la transition entre inspiration et expiration (Buonviso et al., 2006; Manabe and Mori, 2013). La présentation d'une odeur déclenche le plus souvent des oscillations bêta (15-40 Hz) d'amplitude variable, mais est aussi associée dans certains cas à une augmentation du gamma dans le BO (Beshel et al., 2007). Enfin, dans le BO, des bouffées sporadiques de gamma de basse fréquence (35-65 Hz) peuvent apparaître pendant l'exploration (Kay, 2003).

Les activités oscillatoires du BO sont « calées » sur la respiration qui comprend deux phases. La première phase, ascendante, correspond à l'inspiration, alors que la descente correspond à la phase d'expiration (Buonviso et al., 2003; Kay and Stopfer, 2006; Roux et al., 2006; Cenier et al., 2008, 2009; Rojas-Líbano and Kay, 2008a; Kay et al., 2009). Le rythme gamma observé en activité spontanée chez les animaux éveillés se superpose à la modulation respiratoire, il arrive à la transition inspiration/expiration, au pic de l'oscillation, et se poursuit quelques fois pendant une partie de l'expiration. Chez l'animal anesthésié, la stimulation olfactive entraîne une alternance des bouffées bêta et gamma, le bêta s'intercalant préférentiellement entre les bouffées de gamma, en fin d'expiration et donc au creux de l'oscillations thêta (Buonviso et al., 2003; Rojas-Líbano and Kay, 2008b; Kay et al., 2009).

3.3.4.1 Oscillations Thêta

Le traitement olfactif est directement conditionné par la fréquence respiratoire, qui chez les rongeurs varie de 1 à environ 12 Hz, selon l'état attentionnel de l'animal et la tâche comportementale dans laquelle il est engagé. L'animal est capable de réguler sa fréquence respiratoire : celle-ci est basse à l'état passif, mais elle augmente lors du flairage, qui est un mécanisme comportemental permettant d'échantillonner les odeurs connues de l'environnement et de rendre plus saillantes celles qui ne le sont pas (Verhagen et al., 2007). Les oscillations thêta sont aussi appelées oscillations respiratoires, dans la mesure où elles sont déclenchées par un stimulus sensorimoteur et se synchronisent avec le cycle respiratoire (Buonviso et al., 2003; Cenier et al., 2008, 2009; Kay & Stopfer, 2006), grâce à la mécano-sensibilité de certaines cellules vis-à-vis des flux d'air de la cavité nasale (Grosmaître et al., 2007; Courtiol et al., 2011). Le cortex piriforme, structure sur laquelle projette les neurones de sortie du BO, exprime également des oscillations thêta, qui peuvent être fortement couplées à celles du BO lorsque l'animal est à l'état de repos ou lorsqu'il explore une odeur (Kay, 2005). La plupart des données recueillies sur les oscillations thêta l'ont été à partir d'animaux anesthésiés ou au repos, quand le cycle respiratoire de l'animal est constant et de faible fréquence. Quand l'animal explore l'environnement de façon active en reniflant rapidement, les oscillations du LFP semblent malgré tout

suivre le cycle respiratoire, mais le motif de décharge des cellules mitrales se découple du cycle respiratoire et devient plus ou moins tonique (Kay, 2005).

On ne connaît que partiellement les mécanismes à l'origine de ces oscillations. Comme indiqué précédemment, l'activité rythmique pourrait être générée par la synchronisation des afférences provenant des OSN, qui sont mécanosensibles et donc activés par le flux d'air (Grosmaître et al, 2007). Au sein du BO, les cellules à panache de la couche glomérulaire déchargent à une fréquence correspondant à celle des oscillations thêta (Hayar et al., 2004). Des expériences ont également démontré qu'il existait une modulation centrale et périphérique du rythme respiratoire, puisque les M/TC d'animaux anesthésiés sous uréthane et soumis à une intubation trachéale conservaient tout de même un motif partiel de décharge selon un motif respiratoire (Ravel and Pager, 1990). On dispose de peu d'information sur les circuits centrifuges modulant les oscillations thêta du BO. La cohérence de phase qui existe à certains moments entre signaux thêta hippocampiques et thêta du BO semble indiquer que l'hippocampe est impliqué dans cette modulation centrale lorsque l'animal renifle de façon rapide (Macrides et al., 1982). Les oscillations thêta du BO permettent une représentation interne des actes sensorimoteurs de flairage et de respiration, mais leur rôle fonctionnel dans des tâches cognitives demeure difficile à élucider (Kay, 2005).

3.3.4.2 Les oscillations gamma

Le rythme classiquement étudié dans le système olfactif a été le rythme gamma (Rojas-Líbano and Kay, 2008a; Kay et al., 2009; Martin and Ravel, 2014). En l'absence de stimulations odorantes imposées, en particulier lorsque les animaux explorent librement leur environnement, la présence de bouffées de gamma, pendant la transition inspiration/expiration du cycle respiratoire, caractérise le LFP dans le BO et au moins dans le PC antérieur. En plus de la nature ubiquitaire de ces bouffées de gamma dans le système olfactif, le fait que la fréquence du gamma soit reconnue comme la référence pour le codage du codage sensoriel suite aux travaux de Wolf Singer dans le système visuel (Singer, 1993b) a probablement amené la communauté scientifique à s'intéresser à cette gamme de fréquence particulière.

Ces oscillations sont rapides (~40-100Hz) et arrivent en bouffées pendant la transition inspiration/expiration du cycle respiratoire (Buonviso et al., 2003; Rojas-Líbano and Kay, 2008a; Cenier et al., 2009; Kay et al., 2009; Courtiol et al., 2011). Elles ont lieu de manière spontanée chez les animaux éveillés (Martin et al., 2004a, 2006) ou anesthésiés avec un mélange kétamine/xylazine (Chery et al., 2014) alors qu'elles ne se manifestent qu'en réponse à l'odeur chez les animaux anesthésiés à l'uréthane (Neville and Haberly, 2003; Cenier et al., 2008; Courtiol et al., 2011) (figure

1.7), sauf dans l'étude de Aylwin et collaborateurs (2009) qui obtiennent un profil d'animal éveillé avec une induction à la kétamine et un maintien de l'anesthésie à l'uréthane. L'amplitude des bouffées gamma diminue en fonction de la profondeur de l'anesthésie chez les animaux sous kétamine/xylazine (Fontanini and Bower, 2005). Leur fréquence peut également varier selon les espèces, l'état de vigilance et l'anesthésique utilisé. Ainsi, les fréquences décrites dans la littérature vont de 40-90 Hz (Rojas-Líbano and Kay, 2008b; Kay et al., 2009) à 50-100 Hz voire 130 Hz sous kétamine, (Neville and Haberly, 2003)).

L'origine de ces oscillations est mieux connue que pour le thêta ou le bêta. Elles sont liées aux interactions excitato-inhibitrices de la boucle M/TC/GC et sont décrites dans un grand nombre d'études. L'activité gamma étant abolie suite à l'obstruction des narines (Gray and Skinner, 1988a), elle serait déclenchée par l'activation mécanique des OSN (Grosmaître et al., 2007), puis des M/TC lors de l'inspiration. Les bouffées gamma seraient ainsi générées par une activation faible mais synchrone des M/TC à chaque nouveau cycle respiratoire, déclenchant un retour inhibiteur des GC. Un article important publié par (Lepousez and Lledo, 2013) a permis de décrire les éléments du circuit bulbaire responsables de la génération du rythme gamma : c'est le couplage au niveau des synapses réciproques entre les cellules MC et GC, et particulièrement l'inhibition dendrodentritique reçue par les MC, qui génère et module la fréquence du gamma. Ces bouffées de gamma sont ensuite transmises au PC (Mori et al., 2013). Une inhibition des afférences centrifuges descendantes (par refroidissement ou avec un anesthésique local) induit une augmentation et non pas une réduction de l'amplitude des bouffées de gamma (Gray and Skinner, 1988b; Martin et al., 2006). Par ailleurs, la section du LOT, qui interrompt les connexions entre BO et PC, abolit les bouffées gamma sélectivement dans le BO (Neville and Haberly, 2003). Les fibres centrifuges ne semblent pas fortement impliquées dans les oscillations gamma qui sont plutôt une propriété émergente des circuits bulbaires.

3.3.4.3. Les oscillations bêta

Neville et Haberly (2003) proposent deux théories, non exclusives, quant à l'origine de l'activité oscillatoire bêta. Elle serait due à (i) une boucle comprenant 3 acteurs interconnectés M/TC et GC du BO et spécifiquement des fibres centrifuges des cellules pyramidales du cortex piriforme (ii) aux volées de PA provenant des différentes aires corticales qui exercent un retour centrifuge vers le BO. Sur tranche de BO de rat, les oscillations sous liminaires du potentiel de membrane des M/TC ont une fréquence comprise entre 10 et 40 Hz (Chen & Shepherd, 1997; Desmaisons et al., 1999). Chez l'animal anesthésié, des décharges de PA à des fréquences proches et synchronisées avec le bêta sont décrites dans la couche des M/TC (Cenier et al., 2009) et celle des GC (Buonviso et al., 2003), ce qui

renforce la probabilité d'une implication de la boucle M/TC/GC. Toutefois, à ma connaissance, aucun lien de causalité n'a été établi entre les oscillations bêta et la décharge de ces cellules.

L'échantillonnage d'une odeur s'accompagne de l'émergence d'une activité dans la bande de fréquence bêta (15-40 Hz, centré autour des 25Hz) qui n'est jamais observée en l'absence d'odeur, et qui concorde souvent avec une diminution de l'activité gamma. Cette transition dans la dynamique oscillatoire entre fréquence gamma et bêta est caractéristique de l'échantillonnage d'une odeur chez des animaux éveillés et a été relevée dans de nombreuses études portant sur le BO (Gray and Skinner, 1988a; Martin et al., 2004a; Lowry and Kay, 2007; Lepousez and Lledo, 2013; Chery et al., 2014) et le PC (Martin et al., 2006).

L'équipe de C. Vanderwolf (Vanderwolf et al., 2002) a montré que des rats éveillés soumis à une présentation passive d'odeurs supposées pertinentes ou aversives de façon innée (urine, fèces, toluène, odeurs de prédateurs...) présentaient une activité de basse fréquence (environ 20Hz), déclenchée par ces odeurs, dans de nombreuses structures olfactives, incluant le BO, le PC, et des structures limbiques (cortex entorhinal, gyrus dentelé). Ils ont également observé que des présentations répétées de ces odeurs (10-15 essais) induisaient une augmentation progressive de l'amplitude des ondes bêta qui persistait pendant plusieurs jours. Il est à noter que l'inhibition pharmacologique des afférences centrifuges vers le BO abolit les oscillations bêta à la fois dans le BO et le PC, contrairement à ce qui est observé pour les oscillations gamma (Martin et al., 2006). Les résultats de Vanderwolf ont été confirmés par (Lowry and Kay, 2007) chez le rat éveillé, qui ont également décrit une forte activité bêta suite à la présentation passive de certaines odeurs dans une gamme définie de pression de vapeur saturante. Des observations similaires ont été rapportées chez des rats anesthésiés à l'uréthane (fig 1.7), chez lesquels les caractéristiques moléculaires des odeurs influençaient la probabilité de l'apparition d'oscillations bêta (Cenier et al., 2008). Ces études semblent indiquer que la puissance des ondes bêta pourrait dépendre de la volatilité des odeurs plutôt que de leur valeur intrinsèque. Toutefois, ces résultats pourraient être dus au mode de présentation de l'odeur (un coton-tige), qui ne permet pas de contrôler précisément la concentration et la durée pendant laquelle l'odeur est délivrée, et pourrait induire une composante aversive aux odeurs présentées (Martin and Ravel, 2014).

3.3.5 Modulation de l'activité oscillatoire dans le BO par la nature et la concentration de l'odeur chez le rongeur anesthésié

Lorsque les animaux reçoivent une stimulation odorante, plusieurs profils oscillatoires peuvent apparaître (figure I.8)(pour revue détaillée (Martin and Ravel, 2014)). Chez les animaux anesthésiés à

l'uréthane, des oscillations bêta et gamma peuvent être évoquées pendant une même stimulation odorante (Neville & Haberly, 2003 ; Buonviso et al., 2003 ; Cenier et al., 2008 ; Cenier et al., 2009 ; Courtiol et al., 2011). Trois profils de réponse sont décrits (Cenier et al., 2008) : (i) un premier profil dit classique se caractérise par une augmentation de la puissance des oscillations des deux bandes bêta et gamma, la bande gamma ayant lieu à la transition inspiration/expiration et la bande bêta ayant lieu à la fin de l'expiration (figure I.10.C), (ii) un profil dit « bêtaless », qui se caractérise par une augmentation de la puissance des oscillations de la bande gamma, sans réponse dans la bande bêta et enfin (iii) un profil dit « gammaless », qui se caractérise par une augmentation de la puissance des oscillations bêta uniquement, avec une oscillation bêta décalée dans le temps (figure I.7.D).

Il semble que la nature de l'odeur n'affecte pas les propriétés intrinsèque des oscillations dans les deux bandes, mais détermine l'induction de l'un de ces trois profils en fonction de la longueur de la chaîne carbonée, des groupements chimiques de la molécule et de la concentration des odorants. Neville et Haberly (2003) décrivaient aussi trois profils légèrement différents des précédents et, fait intéressant, qui varient de la même façon selon la concentration de l'odeur. Ainsi, l'acetate d'isoamyl induit un profil classique pour une concentration « moyenne », une réponse du type gammaless à plus faible concentration et une réponse de type bêtaless pour une forte concentration (figure I.7.B). L'intensité de la stimulation peut aussi varier avec les flux d'air, ce qui a une influence sur le profil des activités oscillatoires. Dans une expérience sur des rats trachéotomisés, Courtiol et al. (2011) ont fait varier l'intensité des flux d'air entrant dans la cavité nasale. Lorsque le flux d'air mime une condition naturelle, ils observent un profil de réponse classique à l'isoamyl acetate. L'augmentation du flux d'air induit l'augmentation de la puissance du gamma alors que la diminution du flux induit l'augmentation de la puissance du bêta au détriment du gamma. Dans ce cas, l'alternance bêta/gamma est supprimée, et l'oscillation bêta se poursuit au-delà de sa phase normale et est simultanée avec le gamma, plus faible.

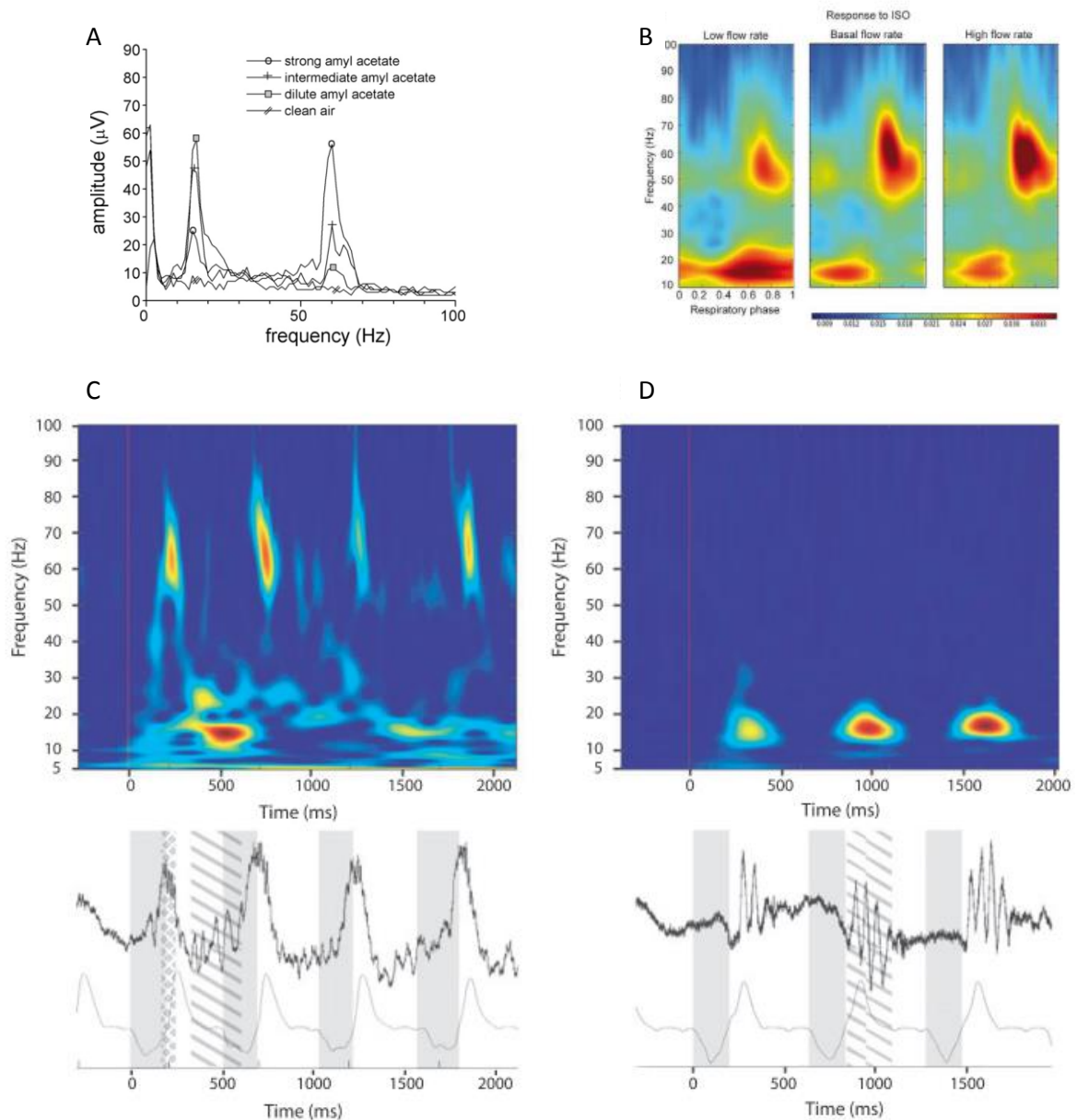


Figure 1.7 Réponses oscillatoires pour différents odorants chez le rat anesthésié. En haut : A) Spectre des puissances pour différents types de stimulations: air pur ou concentration faible, intermédiaire et forte d'Acetate d'Isoamyl (Neville and Haberly, 2003). B) cartes temps/fréquence en réponse à l'acetate d'isoamyl avec un flux d'air variable : basal, faible et fort. A et B : dans les deux cas, les fréquences bêta sont favorisées par les faibles stimulations et les fréquences gamma par les fortes stimulations. C) et D) En haut, cartes temps/fréquence représentant la puissance de l'oscillation (en code couleur) en fonction de la fréquence (en ordonnées) du temps (en abscisses) avant et après l'odeur ($t=0$) chez des animaux anesthésiés à l'uréthane. Bas : Signaux bruts et modulation respiratoire correspondants aux cartes temps/fréquence. C. Réponse à l'odeur d'éthyl pentanoate impliquant deux types d'oscillations : gamma en fin d'inspiration (losanges gris) avec un pic de puissance autour de 60 Hz, et bêta (hachuré) avec un pic de puissance autour de 15 Hz. D) Réponse à l'odeur d'hexanal induisant uniquement un pattern de réponse dans la bande bêta autour de 15 Hz. A noter : le bêta est légèrement décalé par rapport au cycle respiratoire comparé au profil mixte (Cenier et al., 2008).

Les différences de profils en fonction de l'intensité de la stimulation olfactive pourraient s'expliquer par un modèle proposé par Neville et Haberly (2003). Il nous paraît intéressant de présenter brièvement ce modèle et de le discuter de manière très sommaire car il témoigne des difficultés rencontrées dans l'explication des réponses oscillatoires aux odeurs. Selon ce modèle, les fortes stimulations activeraient fortement les M/TC qui enverraient les PA le long de leur axone mais aussi de leurs dendrites secondaires. Ces dendrites sont le siège de courants de type transitoire appelés courants IA. Ils sont dus à des canaux ioniques potassiques voltage-dépendants, qui en hyperpolarisant les dendrites secondaires atténuent l'amplitude des PA au fur et à mesure qu'ils s'éloignent du soma des M/TC. Selon ce modèle, de fortes stimulations engendrent des dépolarisations toniques plus importantes qui inactivent les canaux potassiques responsables des courants IA (qui nécessitent une hyperpolarisation pour se réactiver après inactivation). Ceci entraînerait une propagation plus lointaine et plus durable des PAs qui activeraient davantage de synapses M/TC/GC. Les GC sont également dotées de canaux de ce type qui sont inactivés par une forte dépolarisation et répondraient plus rapidement aux M/TC. La combinaison de ces deux mécanismes augmenterait l'efficacité de la boucle M/TC/GC, ce qui renforcerait l'oscillation gamma. Plus intéressant encore, selon ce modèle la fréquence bêta qui est observée lors de stimulations faibles s'explique par le fait que la stimulation n'induit pas de volées de PA suffisante pour inactiver les IA : les PA ne peuvent pas se propager suffisamment loin dans les dendrites secondaires pour induire les oscillations gamma mais arrivent via les axones aux structures corticales, qui sont impliquées dans la génération des oscillations bêta.

Ce modèle très séduisant explique les réponses dans les bandes de fréquence gamma et bêta observée par les études que nous avons citées (Neville & Haberly, 2003 ; Cenier et al., 2008), mais ne peut expliquer la réponse précoce observée par Courtiol et al. (2011) dans la bande bêta autour de la transition inspiration/expiration. Ceci suggère donc une activation de la boucle M/TC/GC à une basse fréquence et pourrait expliquer l'apparition de la réponse en bêta dans une phase aussi précoce. Cela dit, cette dernière explication reste complètement hypothétique et aucune preuve n'a été fournie quant à la présence de ces fréquences de décharges préférentiellement lors de faibles stimulations. Comme nous l'évoquons plus haut, ce modèle témoigne de la complexité de l'explication de ces réponses oscillatoire et de la longueur du chemin qui reste à parcourir pour expliquer le rôle fonctionnel des oscillations dans le codage temporel des odeurs.

Fait important à noter pour comprendre la complexité et la difficulté de l'étude de la représentation temporelle des odeurs dans le BO, la reproductibilité des profils oscillatoires n'est pas stricte d'un animal à l'autre, comme nous l'avons vu pour les différents profils (Cenier et al. 2008) ou dans le fait que tous les animaux ne répondent pas forcément à toutes les stimulations (Neville & Haberly, 2003).

La stimulation odorante induit aussi des changements du profil oscillatoire chez les animaux éveillés. Les premières études se sont intéressées exclusivement aux oscillations gamma (Freeman and Schneider, 1982; Di Prisco and Freeman, 1985) mais la plupart du temps celles-ci diminuent pendant l'échantillonnage d'une odeur. Les oscillations bêta ont été enregistrées pour la première fois dans le BO suite à la présentation d'odeurs dotées d'une signification particulière pour les animaux, comme des odeurs de prédateurs, ou des odeurs aversives de xylène ou de toluène (Heale et al., 1994; Zibrowski & Vanderwolf, 1997). Toutefois, cet effet pourrait être dû à la volatilité des odeurs. En effet, le bêta évoqué par des stimulations passives présente une puissance variable en fonction de la pression de vapeur saturante des odeurs (Lowry & Kay, 2007) ce qui va dans le sens des résultats trouvés chez les rats anesthésiés (Cenier et al, 2008). Les oscillations bêta sont fortement amplifiées suite à des apprentissages (Ravel et al., 2003, Martin et al., 2004 ; Martin et al., 2006)(figure 1.8). Ce type de plasticité des réponses oscillatoires du LFP suite à un apprentissage est l'objet du paragraphe suivant.

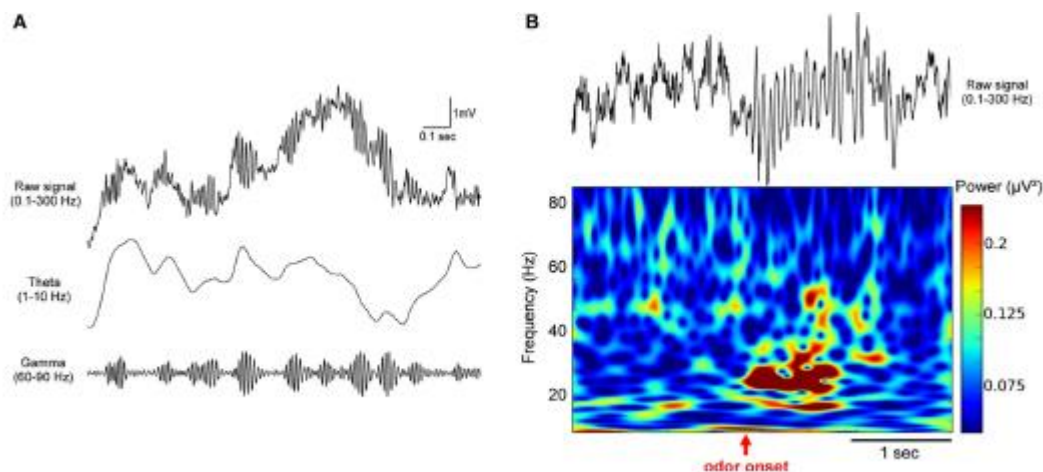


Figure 1.8 La stimulation olfactive modifie les oscillations bêta (15-35Hz) et gamma (60-90Hz) dans le BO. Exemples de signaux LFP enregistrés dans le BO de souris éveillées et libre de leurs mouvements. A. Le signal LFP brut (0.1-300Hz) est représenté sur la ligne supérieure. Sur la ligne centrale, ce même signal est filtré entre 1 et 10 Hz et représente la bande de fréquence thêta, et sur la ligne inférieure, le signal est filtré entre 60 et 90 Hz, et représente la bande de fréquence gamma. Ces deux bandes indiquent la relation étroite entre bouffées gamma et modulation respiratoire. B. Signal LFP brut (0.1-300Hz) et la représentation de sa puissance en fonction du temps et de sa fréquence acquis chez une souris conditionnée au cours d'une tâche de Go/No-Go. Le graphique temps-fréquence a été obtenue d'après l'analyse des ondelettes de Morlet. Il représente la puissance du signal (comme indiqué sur l'échelle de couleur) en fonction du temps (axe des abscisses) pour chaque fréquence (axe des ordonnées). Le début de la stimulation olfactive est indiqué par la flèche rouge. Chez un animal conditionné, l'odeur induit une diminution générale de la puissance de la bande gamma et une augmentation de la puissance de la bande bêta. (figure de Martin et Ravel, 2014)

3.3.6 Oscillations du BO et apprentissage

Chez l'animal éveillé, les oscillations bêta dans le BO sont impliquées dans des tâches cognitive et d'apprentissage (Gervais et al., 2007; Martin et al., 2004; Martin et al., 2006) et sont sous la dépendance des structures corticales centrales (Neville and Haberly, 2003; Martin et al., 2006).

Comme décrit précédemment, les oscillations bêta sont observées chez l'animal naïf uniquement lorsque les odeurs présentées sont toxiques ou aversives (Vanderwolf et al., 2002), et des odeurs neutres non familières déclenchent uniquement des oscillations bêta de faible amplitude. Toutefois, dès le moment où ces odeurs acquièrent une signification comportementale pour l'animal au cours d'une tâche d'apprentissage, l'amplitude des oscillations bêta augmente progressivement (Ravel et al., 2003; Martin et al., 2004). Cette augmentation de la puissance des oscillations bêta a été observée dans plusieurs structures impliquées dans le traitement des odeurs, notamment dans le cadre d'une tâche comportementale de Go/No-Go : dans le BO et le PC (Ravel et al., 2003; Martin et al., 2004), mais aussi dans le cortex enthorinal et l'hippocampe, de façon synchronisée avec le BO suite à une stimulation odorante (Martin et al., 2007; Gourévitch et al., 2010). D'autres études utilisant des paradigmes comportementaux différents ont également montré cette hausse des oscillations bêta, à la fois dans une tâche de choix alternatifs (Fuentes et al., 2008), et dans le cadre d'une aversion olfactive conditionnée pour un réseau très large de structures incorporant non seulement les structures olfactives mais aussi le cortex orbitofrontal (Chapuis et al., 2009). Les caractéristiques olfactives des oscillations bêta ne sont pas homogène dans le BO, contrairement au bouffées gamma, et leur amplitude varie avec l'odeur présentée, indépendamment de la récompense associée à celle-ci (Martin et al., 2004b, 2007). Les données obtenues au cours de ces études suggèrent qu'après un apprentissage, la spécificité des oscillations bêta évoquée par une odeur véhiculerait certaines caractéristiques de cette dernière, en plus de refléter la signification que l'odeur a acquise pour l'animal (Martin and Ravel, 2014).

Dans le cadre d'une tâche de Go/No-Go, et de façon concomitante avec la hausse des oscillations bêta, on observe le plus souvent une forte diminution des oscillations gamma lors de l'échantillonnage des odeurs. Cette diminution de puissance a été observée à la fois chez des animaux naïfs, et de façon plus prononcée chez des animaux experts, mais elle est transitoire et revient à ses niveaux de base en se synchronisant avec l'activité respiratoire de l'animal (Ravel et al., 2003; Martin et al., 2004a, 2006; Gourévitch et al., 2010; Lepousez and Lledo, 2013). Toutefois, certaines études ont montré une hausse des oscillations gamma en lieu et place de celle des oscillations bêta (Beshel et al., 2007; Rosero and Aylwin, 2011).

Les oscillations gamma ont été particulièrement étudiées dans plusieurs régions du système olfactif par Walter Freeman (Freeman, 1960; Freeman and Schneider, 1982), qui a concentré ses

analyses sur une gamme de fréquence assez large (20-90 Hz). Comme il a été décrit dans de nombreuses études, l'amplitude des bouffées de gamma s'accroît proportionnellement à l'état attentionnel de l'animal (Bressler, 1984; Eeckman and Freeman, 1990). Cette relation à l'attention et la motivation est facilement observable au cours de la phase initiale de n'importe quel entraînement. Freeman et ses collaborateurs ont analysé la distribution spatiale de ces bouffées de gamma lors de la présentation d'une odeur (Freeman and Schneider, 1982; Di Prisco and Freeman, 1985), pendant des tâches de conditionnement aversifs ou appétitif. Ils en ont déduit que les motifs spatiotemporels identifiés au cours de l'analyse des bouffées de gamma dépendaient plus de la signification de l'odeur pour l'animal plutôt que de sa nature chimique. Ils ont alors proposé que les oscillations gamma soient principalement modulées par le contexte dans lequel se trouve l'animal.

L'ensemble de ces travaux ont permis à la communauté scientifique de replacer le BO au cœur du système olfactif en tant qu'élément central du réseau sous-tendant les représentations olfactives, alors qu'il était plutôt considéré comme un relai passif. Par ailleurs, ils ont également prouvé que le contexte et l'expérience de l'animal étaient traités dès les premiers relais du traitement de l'information olfactive.

3. Sortie de l'information du BO vers le PC

Avant de conclure sur la représentation spatiotemporelle des odeurs dans le BO, je voudrais brièvement fournir une description anatomo-fonctionnelle du PC, la structure qui reçoit la majorité des efférences du BO. C'est un cortex anatomiquement et fonctionnellement divisé en deux régions : une région rostrale, le PC antérieur, principalement connectée aux autres aires olfactives et une région caudale, PC postérieur, ayant de denses projections antérogades vers de nombreuses régions corticales et sous corticales, incluant des aires associatives. Le PC postérieur ne présente en revanche pas de connexions fonctionnelles avec le PC antérieur. Par ailleurs, les projections du PC postérieur vers le BO sont assez éparses. Il est à noter que d'un point de vue anatomo-fonctionnel, le PC présente des connexions associatives moins abondantes dans sa partie antérieure que dans sa partie postérieure (Hagiwara et al., 2012). Cette connectivité anatomo-fonctionnelle du PC suggère le rôle essentiel de cette structure dans l'élaboration de mécanismes complexes liant perception olfactive et mémoire (Gottfried, 2010; Wilson and Sullivan, 2011). Les différences entre PC antérieur et postérieur soutiendraient l'existence de mécanismes de mémoires complémentaires : comme suggéré dans la littérature, le PC antérieur serait responsable de l'association des odeurs comme la généralisation, la discrimination ou la complétion de certains schémas olfactifs (Wilson and Stevenson, 2003; Chapuis

and Wilson, 2011) alors que le PC postérieur rattacherait plutôt les odeurs à des informations non-olfactives préalablement apprises (Haberly, 2001).

Conclusion du chapitre I

J'ai exposé dans ce premier chapitre les bases anatomo-fonctionnelles des structures d'entrée du système olfactif, MO et surtout BO. Les données d'imagerie et d'électrophysiologie exposées au cours de ce chapitre indiquent que l'information olfactive est représentée à différents niveaux du réseau bulbaire. L'expression d'un seul RO par OSN et le codage combinatoire des odeurs engendrent une représentation spatiale spécifique au niveau glomérulaire. Ces représentations spatiales présentent une plasticité en fonction de la nature de l'odeur et de sa concentration, et ne sont pas figées dans le temps : l'activation des zones glomérulaires évolue dans le temps en fonction des rythmes respiratoires et du rythme d'échantillonnage des odeurs. Au niveau des couches plus profondes, la représentation temporelle des stimulations odorantes est basée sur la synchronisation de sous populations de neurones par rapport aux différents rythmes oscillatoires. De fait, le codage de l'odeur dans le BO est un processus très dynamique, mais également très plastique : la représentation spatiotemporelle des odeurs est fortement influencée par des paramètres respiratoires, par les propriétés intrinsèques des odeurs, mais également par la valeur et la signification associée à chaque odeur après un apprentissage. Une partie de cette plasticité se met en place de façon très précoce, dès l'entrée du système olfactif, mais est également intrabulbaire, avec un rôle important des retours centrifuges émanant de structures corticales supérieures, notamment du PC.

La suite de l'introduction sera consacrée à la description des différents mécanismes contrôlant la prise alimentaire, la régulation de la balance énergétique et l'obésité, et la manière dont ces derniers interagissent avec le système olfactifs et impactent la représentation spatiotemporelle des odeurs.

Chapitre II : Métabolisme énergétique, prise alimentaire et obésité

Choisir si nous voulons manger ou non, à quel moment, et décider de la teneur et de la quantité de ce que nous allons ingérer : ce sont des décisions familiales pour la plupart d'entre nous et que nous prenons sans effort apparent. Ces décisions sont influencées chez les mammifères par de nombreux paramètres internes au corps (l'état nutritionnel, motivationnel...) et externes, de l'environnement (la disponibilité en aliments mais aussi les références familiales chez l'Homme...), ce qui explique des fortes variations intra- et inter-individuelles en apports énergétiques quotidiens. Malgré ces fortes variations, l'homéostasie énergétique permet d'équilibrer dépense et apport énergétique pour stabiliser la masse corporelle sur de longues périodes de temps (Morton et al., 2014). Cette homéostasie est fortement dépendante d'un dialogue régulé entre le cerveau et le tractus digestif (mais aussi le pancréas, le tissu adipeux, la thyroïde...) qui tourne sur la base de boucles de rétroactions qui contrôlent la prise alimentaire. De nombreuses structures du système nerveux central possèdent des récepteurs aux hormones de signalisation du métabolisme énergétique synthétisées en périphérie et intègrent les informations nutritionnelles qualitatives et quantitatives de la nourriture ainsi que le statut des réserves et les besoins énergétiques de l'organisme. Ces hormones induisent l'activation de signalisation orexigène ou anorexigène (Morton et al., 2006) et participent à la régulation de la balance énergétique : il est donc nécessaire pour le cerveau de connaître précisément le contenu du tractus digestif en périphérie et l'état d'utilisation des substrats énergétiques circulants et stockés (réserves à court terme de glycogène hépatique, réserves à long terme de triglycérides dans le tissu adipeux). La relation à l'aliment consommé s'accompagne d'une forte activité sensorielle, limbique, motivationnelle et cognitive et sa complexité s'établit avec le temps, pendant le développement. Notamment, les systèmes sensoriels semblent avoir un rôle important dans la prise alimentaire, ne serait-ce que par leur implication dans la valeur qualitative des aliments, leur goût, leur odeur mais aussi la valeur hédonique qu'ils peuvent avoir et qu'on peut définir par le terme de palatabilité.

L'efficacité de ce système de régulation de la balance énergétique corporelle est pourtant mise à mal dans nos sociétés, comme l'attestent régulièrement les rapports de l'Organisation Mondiale de la Santé qui met en évidence une progression inexorable de la pandémie mondiale d'obésité, qui devient, avec les maladies et les complications qu'elle induit, un des problèmes de santé publique majeur du XXIème siècle. Selon les dernières estimations disponibles, 1,9 milliard d'adultes sont en surpoids et 600 millions d'entre eux sont obèses dans le monde. Près de 2,6 millions de personnes décèdent des conséquences d'un surpoids chaque année dans le monde (statistiques du site web de l'OMS de janvier 2015). De plus, 80% des personnes ayant développé une obésité sont atteints de maladies relatives à cette obésité comme le diabète, l'hyperlipidémie, l'hypertension ou les problèmes cardiovasculaires (Simpson et al., 2009). De façon dramatique, l'obésité touche également les très jeunes enfants : 42 millions d'enfants de moins de 5 ans étaient concernés par des problèmes de surpoids ou d'obésité en

2013. Les origines de ces troubles sont nombreuses et impliquent entre autres, la sédentarité, la prédisposition génétique et au premier plan le dérèglement des comportements alimentaires.

L'approvisionnement de l'organisme en énergie est discontinu dans le temps et assuré par des prises ponctuelles qui, selon les espèces et l'état interne de l'individu, varient dans la quantité de nourriture ingérée et dans les moments de la journée où elles ont lieu (Macht, 1999; Le Magnen, 2001) : par exemple, chez certaines espèces qui hibernent comme la marmotte, le comportement alimentaire change en fonction de la saison, en terme de quantité, de qualité et de gestion des stocks (Florant et al., 2010). La balance énergétique est ainsi en grande partie régulée par un ensemble de cycles circadiens que je ne développerai pas dans ce chapitre : le cycle temporel séparant les repas, mais aussi les cycles de sommeil et d'éveil, afin d'assurer une coordination faim/vigilance pendant la journée et une coordination sommeil/satiété à la tombée de la nuit (du moins pour les espèces diurnes)(VanItallie, 2006). Chez la souris, une induction chronique de décalage horaire est suffisante pour induire une résistance à la leptine (Kettner et al., 2015) qui est détectée chez les personnes obèses (Flier, 2004). L'obésité peut être induite chez des souris par un décalage horaire du cycle jour nuit deux fois par semaine, les souris qui étaient nourries à heure fixe ne développant pas de problème malgré un apport calorique identique à celle des souris l'ayant développé (Oike et al., 2015).

Je présenterai dans ce chapitre les mécanismes physiologiques périphériques et centraux impliqués dans la régulation de la prise alimentaire et je ferai un point sur les dysfonctionnements de ces mécanismes qui ont été décrits dans la situation pathologique qu'est l'obésité, en clinique et chez les modèles de rongeurs. Je n'aborderai pas ici le rôle dans la prise alimentaire des grands systèmes neuromodulateurs monoaminergiques (sérotonine, dopamine et noradrénaline) qui font l'objet d'une littérature riche mais qui ne sont pas, du moins pour le moment, parmi les candidats qui pourraient lier olfaction, prise alimentaire et obésité.

1. Régulation centrale de la prise alimentaire

La synchronisation entre les différents organes qui interviennent dans la régulation de la prise alimentaire nécessite une batterie de senseurs et une communication adéquate afin d'adapter en permanence leur action en fonction de l'état nutritionnel de l'organisme et ses besoins énergétiques. Les systèmes sympathiques et parasympathiques du système nerveux autonome sont un lien important entre le cerveau et les autres organes en périphérie impliqués dans la prise alimentaire. Leur activité est fortement modulée au niveau central par l'hypothalamus et le noyau du tractus solitaire (NTS). On

a longtemps cru que l'hypothalamus était l'unique structure centrale régulée par la prise alimentaire mais aussi impliquée dans la régulation de la prise alimentaire .parce que possédant les récepteurs aux molécules de signalisation du métabolisme énergétique, mais l'expression de ces récepteurs étant maintenant observés dans un nombre important de structures cérébrales. il se dessine un réseau complexe et large qui intervient de concert avec l'hypothalamus pour réguler la prise alimentaire et qui est sensible à la signalisation des molécules impliquées dans la balance énergétique. Il convient dans ce contexte de définir l'action globale des peptides et hormones du métabolisme énergétique mais aussi leur rôle spécifique au sein de ce réseau.

Le cerveau joue un rôle très important dans la gestion des réserves énergétiques et la régulation de la balance énergétique corporelle. Il est également capable d'intégrer des informations sur l'environnement interne et externe de l'organisme, pour, au final, moduler le comportement alimentaire. Ceci nécessite que les structures responsables de la détection du statut nutritionnel soient en relation avec les structures de prise de décision et les structures motrices qui permettent de mettre en œuvre la consommation d'aliments (pour revue (Fehm et al., 2006; Suzuki et al., 2010). Comme ces liens sont encore très mal connus, nous nous concentrerons ici sur le résumé des grandes lignes des connaissances à propos des structures principales intervenant dans la prise alimentaire, comme l'hypothalamus et le reste du système limbique ainsi que le tronc cérébral avec le NTS. Mon but est de présenter brièvement les différentes molécules de signalisation en me basant sur les articles et revues majeurs de la littérature, pour indiquer en détails dans le chapitre III, leur rôle dans les interactions olfacto-alimentaires. Je propose un schéma récapitulatif de cette description dans le figure 1.10 de la page 76.

1.1. L'hypothalamus

L'hypothalamus, situé juste en dessous du thalamus, est entre autres le centre régulateur de l'appétit et de l'homéostasie énergétique, comme l'ont montré les travaux de Hetherington et Ranson dès 1942, complétés par ceux d'Anand et Brobeck en 1951. Provoquant des lésions de l'hypothalamus ventromédian, ces auteurs ont constaté que ces dernières induisaient une hyperphagie et une obésité. A *contrario*, des lésions de l'hypothalamus latéral se caractérisaient par une anorexie et une perte de poids. Cette représentation dichotomique a évolué, et différents noyaux aux rôles spécifiques ont été identifiés au sein de l'hypothalamus : le noyau arqué (ARC), le noyau paraventriculaire (PVN), l'aire hypothalamique latérale (LHA), le noyau ventromédial (VMN), et le noyau dorsomédial (DMN). L'ARC est adjacent à l'éminence médiane dont la barrière hémato-encéphalique est incomplète, et

permet aux hormones et aux nutriments d'atteindre la structure facilement. Par ailleurs, l'ARC entoure le 3^{ème} ventricule cérébral, et les hormones et nutriments présents dans le liquide céphalo-rachidien diffusent à travers l'épendyme du ventricule vers les compartiments extracellulaires de l'ARC (Peruzzo et al., 2000).

A cause de ces spécificités anatomiques, l'ARC est considéré comme une sentinelle métabolique, étant la première zone hypothalamique et cérébrale à détecter des signaux périphériques. Ce noyau contient deux populations neuronales distinctes, aux effets antagonistes : des neurones exprimant des neuropeptides orexigènes, parmi lesquels le neuropeptide Y (NPY) ou encore l'agouti-related peptide (AgRP), co-exprimés dans ces neurones avec le GABA, et fortement inhibés par la leptine ou l'insuline (Chee and Colmers, 2008) ; et des neurones exprimant des neuropeptides anorexigènes, dont la propiomélanocortine (POMC) et le Cocaine-and-Amphetamine-Regulated-Transcript (CART) (Yu and Kim, 2012). Ces deux populations de neurones sont de premier ordre et réagissent directement aux signaux périphériques du métabolisme énergétique, signaux que je détaillerai plus loin. POMC est également le précurseur de l' α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH), un neuropeptide anorexigène puissant appartenant à la famille des mélanocortines agissant sur les récepteurs des mélanocortines 3 et 4 (MC3R et MC4R) présents sur des neurones de second ordre du PVN, du VMN et de la LHA. Ce faisant, l' α -MSH réduit la prise alimentaire et augmente la dépense énergétique. Chez la souris, la délétion de MC4R induit une hyperphagie, une dépense énergétique réduite et un phénotype obèse (Huszar et al., 1997). Il est à noter que chez l'Homme, les mutations de MC4R sont impliquées dans 6% des cas d'obésité précoce sévère, ce qui représente la forme d'obésité monogénique la plus commune et confirme le rôle important du système de la mélanocortine centrale dans l'homéostasie énergétique (Tao, 2005). L'AgRP est un antagoniste de l' α -MSH et se fixe sur les récepteurs MC3R et MC4R (Ollmann et al., 1998). De plus, les neurones NPY/AgRP inhibent les neurones POMC/CART en libérant du NPY et du GABA au niveau de leurs corps cellulaires (Cowley et al., 2001), et l'inactivation des neurones NPY/AgRP chez des jeunes souris induit une baisse significative de la masse corporelle ainsi que de la prise alimentaire (Bewick et al., 2005), suggérant que ces neurones ont une action antagoniste à celle des neurones POMC/CART et ont une influence cruciale sur la stimulation de la prise alimentaire et la prévention de la perte de poids.

Enfin, l'ARC, grâce à un transfert d'information vers le noyau paraventriculaire, joue un rôle de première importance dans le passage de la détection à la réponse motrice de la prise alimentaire.

Les neurones du PVN sécrètent des neuropeptides à l'action catabolique, ce qui inclut la Corticotrophin releasing hormone (CRH), la thyrotropin-releasing hormone (TRH), la somatostatine, la vasopressine et l'oxytocine. Le PVN agit ainsi sur le foie et les tissus adipeux en augmentant

l'oxydation des acides gras et la lipolyse (Foster et al., 2010) et participe au contrôle de la balance énergétique et à la thermogenèse, notamment par le contrôle de la fonction thyroïdienne qui module à la fois la dépense énergétique et la prise alimentaire (Simpson et al., 2009). C'est une voie de sortie de l'hypothalamus. Il constitue un centre d'interaction avec le tronc cérébral et le système nerveux autonome, plus particulièrement le NTS. Il possède également des liaisons intra-hypothalamiques car il communique étroitement avec l'ARC (Zac-Varghese et al., 2010). La destruction ou encore l'haplo-insuffisance de *Sim1* (un facteur de transcription critique pour le développement du PVN) causent une hyperphagie et un phénotype obèse, impliquant qu'il joue également un rôle dans l'inhibition de la prise alimentaire et le gain de poids.

Le VMN est un noyau exprimant notamment le Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF), un neuropeptide anorexigène, et reçoit des projections POMC et NPY/AgRP de l'ARC, et projette sur l'ARC, le DMN et la LHA, ainsi que sur des régions du tronc cérébral. Il contient des neurones senseurs du glucose et de la leptine, et est considéré comme un centre effecteur de la satiété et du maintien de l'homéostasie du glucose (González et al., 2009). Sa destruction induit hyperphagie, hyperglycémie et obésité.

Le rôle du DMN est assez peu documenté (Yu & Kim 2012; Simpson et al., 2009), Il reçoit de très nombreuses projections POMC et NPY de l'ARC et sa destruction induit une hyperphagie et l'obésité.

La LHA a un rôle opposé à celui du PVN, VMN et DMN : sa destruction induit une hypophagie et une perte de poids, et il est de ce fait considéré comme un centre inducteur de l'appétit. Cette structure est composée de neurones exprimant deux neuropeptides orexigènes, la MCH (Melanin Concentrating Hormone) et les orexines. La LHA reçoit les projections NPY/AgRP et α -MSH de l'ARC (Simpson et al., 2009). Les neurones de la LHA produisant des orexines et du MCH sont sensibles au glucose : la libération des orexines est inhibée par le glucose (Burdakov et al., 2006) qui inhibe l'activité des cellules de l'hypothalamus latéral produisant ainsi une diminution de la prise alimentaire (Fehm et al., 2006).

L'injection centrale de MCH (Chung et al., 2011; Kishi & Elmquist, 2005; Simpson et al., 2009) et d'orexine (Date et al., 1999; Kishi and Elmquist, 2005; Simpson et al., 2009) augmentent la prise alimentaire. La MCH possède des récepteurs MCHR1 et 2, seulement le premier est exprimé chez le rat (Simpson et al., 2009). Les récepteurs MCHR1 sont exprimés dans le cortex, l'amygdale, l'hippocampe et le noyau accumbens (Chung et al., 2011). L'administration d'antagonistes des MCHR1 chez la souris diminuent fortement la prise alimentaire (Chung et al., 2011) et les taux de MCH augmente notamment avec la baisse des taux circulants de leptine.

Il existe deux types d'orexine, A et B (appelées également hypocrélines) qui activent leur récepteur OX1R et OX2R distribués largement dans le système nerveux central notamment dans le cortex et l'amygdale (Kishi & Elmquist, 2005) mais également dans le BO (Hardy et al., 2005 ; Prud'Homme et al., 2009).

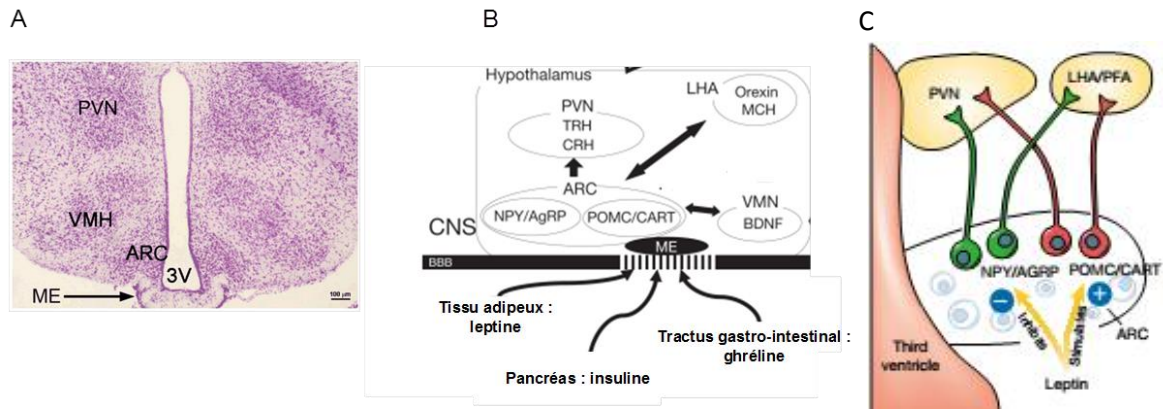


Figure 1.9 Interactions entre les noyaux et les systèmes neuropeptidergiques dans l'hypothalamus. A. coupe histologique de l'hypothalamus. PVN : noyau paraventriculaire, VMH : hypothalamus ventromédian, ARC : noyau arqué, ME : éminence médiane, 3V : 3ème ventricule. B. Représentation schématisée des noyaux hypothalamiques exprimant des récepteurs aux signaux périphériques (leptine, insuline, ghréline) et des neuropeptides qu'ils expriment. L'ARC est constitué de deux populations de neurones (NPY/AgRP et POMC/CART). Il projette sur le PVN dont les neurones synthétisent la TRH et la CRH, sur le LHA dont les neurones synthétisent de la MCH et des orexines et sur le VMN dont les neurones synthétisent du BDNF. C. Schéma d'action de la leptine sur les différentes populations neuronales hypothalamiques de premier ordre (NPY vs POMC) du noyau arqué et les conséquences sur les neurones de deuxième ordre dans le PVN et le LHA. Figure adaptée de (Majdič, 2009). B. Adaptée de (Suzuki et al., 2010). C. Adaptée de Schwartz et al., 2000. Toutes les abréviations des neuropeptides sont explicitées dans le texte précédant cette figure.

1.2. Le tronc cérébral

Le NTS est un noyau du tronc cérébral particulièrement impliqué dans la régulation de la prise alimentaire et de la balance énergétique. Le NTS reçoit de nombreux signaux de satiété du tractus gastro-intestinal à travers les afférences du nerf vague (nerf crânien X), qui est un lien nerveux majeur entre les intestins et le système nerveux central. Il est une cible privilégiée des fibres en provenance de l'hypothalamus, notamment le PVN, et il envoie en retour d'importantes projections au niveau des noyaux hypothalamiques comme l'ARC (Ricardo and Tongju Koh, 1978). A l'instar de l'hypothalamus, une sous-population de neurones du NTS exprime POMC et NPY (Cowley et al., 2001). De plus, les récepteurs MC4R sont également exprimés dans le NTS ainsi que dans le noyau moteur dorsal du nerf vague, situé plus ventralement et à l'origine des efférences vagales en direction du tractus gastro-intestinal (Liu et al., 2003). Ainsi, les injections d'agonistes et d'antagonistes de MC4R dans le quatrième ventricule diminuent et augmentent respectivement la prise alimentaire et la masse corporelle. Les neurones du noyau du tractus solitaire expriment également les récepteurs

CCKA et CCKB de la CCK et l'administration de la cholécystokinine (CCK) directement dans le NTS ou dans le quatrième ventricule induit une diminution de la prise alimentaire (Mercer and Beart, 2004) ; et l'effet satiétogène de la CCK est inhibé en présence d'un inhibiteur de MC4R (Fan et al., 2004). Il est important de rappeler ici que le NTS reçoit aussi les afférences gustatives provenant de la langue donc de l'activation des récepteurs gustatifs localisés dans les bourgeons du goût. Ensemble, les informations sur les changements de la quantité d'énergie disponible portés par le nerf vague, les nutriments, les hormones du tractus gastro-intestinal, les signaux d'adiposité et le goût sont donc intégrés dans le tronc cérébral et l'hypothalamus, avant d'être envoyés vers le thalamus et le cortex insulaire, pour contrôler la prise alimentaire et la masse corporelle de façon autonome et inconsciente.

1.3. Autres structures du système limbique

Les structures centrales reliées aux systèmes sensoriels participent également à la régulation de la prise alimentaire : le thalamus (pour toutes les modalités sensorielles exceptées l'olfaction), le BO, les cortex sensoriels et leurs liaisons avec les structures limbiques sont encore en cours d'étude (Rolls et al., 2005). Le système limbique en tant que tel, par sa fonction dans la mémoire, les émotions, mais aussi en étroite interactions avec le système de récompense (reward system) liée à la nourriture, module la prise alimentaire, notamment en agissant sur la motivation (Rasmussen & Huskinson, 2008; Solinas & Goldberg, 2005; pour revue Bermudez-Silva et al., 2010). Le système dopaminergique lié aux notions de plaisir participe au jugement de la palatabilité des aliments et au contrôle de la prise alimentaire (Barbano et al., 2009). En sus de leur expression dans les régions hypothalamiques qui régulent la balance énergétique, les récepteurs à l'insuline et à la leptine sont également exprimés au sein du système limbique, l'hippocampe et l'amygdale notamment, mais surtout vers le système de récompense, constitué notamment de l'aire tegmentale ventrale (VTA) et du noyau accumbens (NACC). Les mécanismes de 'wanting' et de 'liking' pour la nourriture mais aussi pour toute autre récompense, ont pour substrat neurobiologiques différentes parties du NACC et impliquent également la dopamine. La signalisation au sein de ce système étant impliquée dans la sensation de récompense lors de la prise abusive de drogues ou de nourriture, la leptine et l'insuline pourraient également réguler ces comportements, ce qui ouvre de nouvelles perspectives (Davis et al., 2010).

Enfin, une étude réaffirme l'importance du réseau sensoriel dans la régulation de la prise alimentaire, en montrant notamment chez la souris que la détection sensorielle de nourriture est suffisante pour inverser l'activité des neurones POMC et AgRP du noyau arqué impliqués dans la prise alimentaire, et court-circuite en quelque sorte l'action de signaux orexigènes comme la ghréline. Cette modulation est dépendante du type de neurone, de la palatabilité de la nourriture, de l'état

nutritionnel de l'animal, et anticipe la prise alimentaire. Par ailleurs, l'amplitude et la robustesse des réponses induites par la modulation sensorielle impliquent qu'il s'agit d'un mécanisme de première importance in vivo. La description précise de l'implication du système olfactif en tant que structure régulant la prise alimentaire fera l'objet du chapitre III.

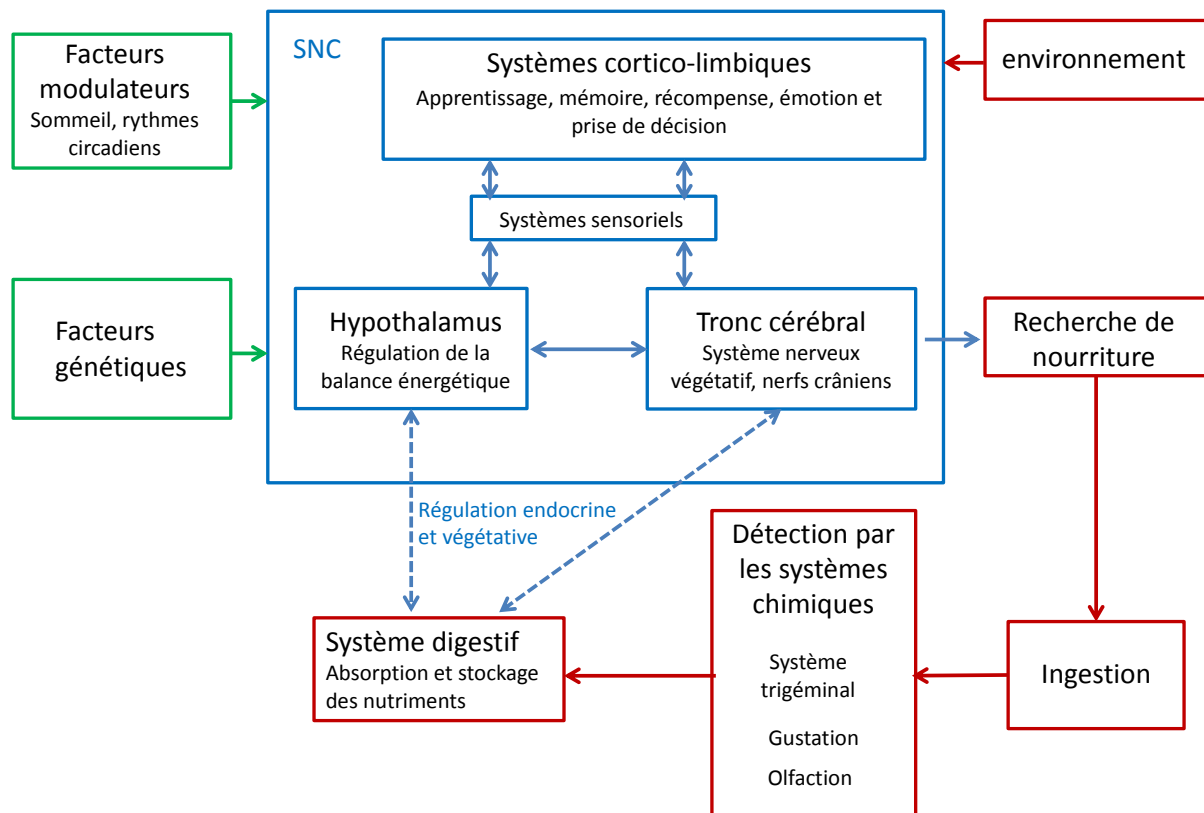


Figure 1.10 Représentation schématique des composants et des flux d'informations majeurs des systèmes centraux et périphériques impliqués dans la régulation de la balance énergétique et de la prise alimentaire. SNC : Système nerveux central.

2. Signaux périphériques de régulation de la prise alimentaire

2.1. Les nutriments

Les aliments que nous consommons sont composés de matières organiques animales ou végétales contenant des macromolécules énergétiques (glucides, lipides et protéines) qui sont dégradées par des enzymes au cours de la digestion : ces lyses successives libèrent des nutriments (petites molécules comme le glucose ou les acides aminés) qui sont seuls capables de traverser la membrane des cellules dans l'intestin. Les aliments contiennent également à plus faibles doses des

vitamines et des oligoéléments minéraux nécessaires au fonctionnement cellulaire, aux équilibres électrochimiques des différents milieux (cellulaire, interstitiel et extracellulaire) et à la signalisation cellulaire. Conjointement à l'évaluation de la qualité sensorielle, le système gustatif semble jouer un rôle dans l'évaluation de la composition énergétique de la nourriture ingérée. En effet, en plus d'une sensibilité classiquement décrite aux saveurs amères, sucrées, salées, acides et umami (DeSimone and Lyall, 2006) ; il existe des familles de récepteurs gustatifs spécifiques capables de reconnaître les acides aminés, les acides gras et les glucides complexes (Matsumura et al., 2009)(Wellendorph et al., 2009). De tels récepteurs sont localisés au niveau des bourgeons du goût à la surface de la langue, mais également tout le long du tractus gastro-intestinal, ainsi qu'au niveau de divers organes comme le foie, le pancréas, le muscle et le tissu adipeux.

La décomposition des aliments commence dès les premières étapes de la prise alimentaire avec la mastication : le broyage mécanique à l'aide des dents permet de déchiqueter les aliments en petites fractions pour permettre un meilleur accès des enzymes digestifs. Une fois dans le tube digestif (estomac/intestin grêle), les sucres sont digérés et décomposés en glucides simples, les protéines en peptides puis acides aminés (AA) et les graisses en acides gras (AG). Les AA et glucides passent la muqueuse duodénale pour arriver dans la circulation. Les AG subissent une solubilisation micellaire par les acides biliaires qui en font des émulsions pouvant passer dans la circulation. Une fois dans la circulation, la source principale d'énergie pour le cerveau est représentée par les glucides : c'est principalement le glucose qui est une source d'énergie immédiate et qui sert également de molécule de signalisation sur l'état de la balance énergétique. Les AG sont les molécules les plus riches en énergie qui servent également de signal de l'état de la balance énergétique mais ne constituent pas la principale source énergétique du cerveau. Ils sont transportés sous forme de lipoprotéines, souvent stockés dans le tissu adipeux, et constituent la majeure partie de l'adipocyte. En cas d'excès de glucides, la totalité des sucres n'est pas utilisée, le stockage est favorisé grâce à l'action de l'insuline notamment dans le muscle et le foie (sous forme de glycogène, un polymère de glucose) par la glycogénogenèse et le tissu adipeux (sous forme de lipides) par la lipogenèse. Ainsi, aux différentes étapes de la digestion et de l'absorption, des chémorécepteurs sensibles aux nutriments informent le système nerveux central de la présence de nutriments dans le canal alimentaire en activant notamment le nerf vague qui innerve largement la sphère intestinale et qui permet l'intégration de ces signaux au niveau du tronc cérébral (Berthoud and Neuhuber, 2000). Par ailleurs, les nutriments présents dans la circulation sanguine peuvent eux-mêmes informer le système nerveux central de l'état alimentaire de l'organisme, par exemple au niveau de l'hypothalamus, en traversant la barrière hématoencéphalique pour pouvoir directement modifier le comportement alimentaire (Berthoud and Morrison, 2008).

2.2. Signalisation par le glucose et les acides gras

Le glucose est le substrat énergétique neuronal principal chez les mammifères. Ses taux circulants sont un fort indicateur du statut nutritionnel. Dès les années 1960, un effet du glucose sur les neurones hypothalamiques qui régulent la prise alimentaire ont été décrits (Anand et al., 1964; Oomura et al., 1969) basé sur les idées originelles de Mayer (1953) et sa théorie « glucostatique » (Mayer, 1996) de la régulation de la prise alimentaire. Cette théorie se définit autour d'une signalisation complexe, notamment avec une régulation des courants potassiques que le glucose induit au niveau hypothalamique (Cf revue de Levin 2001). Les AG, issus de l'alimentation ou de la dégradation des réserves lipidiques, traversent la barrière hémocéphalique et constituent un signal du statut nutritionnel puisqu'ils sont capables de modifier les taux de décharges des potentiels d'action des neurones hypothalamiques (Wang et al., 2006). L'infusion intracérébroventriculaire d'AG (Obici et al., 2002) ou le blocage de leur oxydation (Obici et al., 2003) au niveau de l'hypothalamus réduit la prise alimentaire : ceci laisse penser que ce sont les métabolites des AG qui affectent la prise alimentaire probablement par l'intermédiaire de l'acétylCoA (Migrenne et al., 2007). De manière très intéressante, les neurones sensibles au glucose ne le sont pas pour les AG et inversement, ce qui laisserait supposer qu'une partie des neurones hypothalamiques serait dédiée spécifiquement à la détection des AG et d'autres à celle du glucose (Migrenne et al., 2007).

Les peptides du tube digestifs, et leurs actions sur la prise alimentaire sont décrits de façon exhaustives dans plusieurs revues publiées par (Woods and D'Alessio, 2008; Suzuki et al., 2010; Yu and Kim, 2012). Pour ma part, je ne décrirai que les molécules impliquées dans des interactions entre homéostasie énergétique et système olfactif (interactions qui seront spécifiquement détaillées dans le chapitre III) et qui ont fait l'objet d'une excellente revue (Palouzier-paulignan et al., 2012). Dans la paragraphe suivant, je décrirai l'impact de ces molécules sur le métabolisme énergétique.

2.3. Signalisation par les molécules orexigènes

L'induction de la prise alimentaire peut être effectuée directement que par une seule hormone, la ghréline. Elle est exécutée au niveau cérébral par plusieurs systèmes dont le système des endocannabinoïdes qui est ubiquitaire. A noter ici que la baisse des signaux anorexigènes que nous verrons dans la partie 1.3.3. est aussi un moyen de lever l'inhibition sur la prise alimentaire qui est concomitant à l'action de la ghréline.

2.3.1. Ghréline

La ghréline a d'abord été catégorisée comme le ligand endogène du récepteur de l'hormone de croissance secretagogue (Kojima et al., 1999). On a longtemps considéré par la suite qu'elle agissait principalement en tant qu'« hormone de la faim » sur le système nerveux central pour réguler la prise alimentaire, le poids, l'adiposité et le métabolisme du glucose, et dont le principal facteur de régulation était la prise alimentaire. Récemment, il s'est avéré que cette vision était réductrice, l'action de la ghréline étant plus complexe et impactant de nombreux systèmes périphériques et centraux, incluant par exemple l'apprentissage et la mémoire, la mobilité intestinale ou encore certaines sensations gustatives. L'ensemble de ses actions sont détaillées de façon exhaustive par de nombreux auteurs qui sont cités dans la revue de Müller et al. (2015). Je me cantonnerai à la description de son action sur le métabolisme énergétique, mais il faut garder à l'esprit la complexité et le large spectre d'action de cette hormone. Si les mécanismes moléculaires exacts responsables de la biosynthèse de la ghréline demeurent peu connus, les mécanismes systémiques responsables de la régulation des taux de ghréline circulante sont en revanche bien documentés. Seule hormone orexigène connue, elle est sécrétée principalement par l'estomac, l'intestin grêle et le colon (Pour revue Suzuki et al., 2010 ; Zac-Varghese, 2011). Ses récepteurs GHS-R sont exprimés notamment dans l'ARC de l'hypothalamus : l'administration de ghréline augmente l'activité c-fos dans les neurones NPY/AgRP du noyau arqué (Wang et al., 2002) et la destruction de ces neurones supprime l'effet orexigène de la ghréline (Chen et al., 2004), indiquant que la voie de signalisation NPY/AgRP est la plus importante pour l'action centrale cette hormone. Le principal facteur de régulation de la ghréline est la prise alimentaire : sa concentration plasmatique augmente pendant les longues périodes de jeun, diminue après un repas et augmente au fur et à mesure qu'on s'en éloigne, avec un pic dans la période précédant les repas. Il existe également une régulation centrale de la ghréline : une partie non négligeable de l'élévation de ghréline circulante dans la période préprandiale serait due à l'anticipation du repas par l'animal (Blum et al., 2009; Verhagen et al., 2011). De plus, lorsque la ghréline est injectée dans le système nerveux central, elle a une action sur le nerf vague, le NTS et les autres noyaux hypothalamiques (pour revue Suzuki et al., 2010).

2.3.2. Endocannabinoïdes

Les effets de molécules extraites du *Cannabis sativa* sont connus depuis longtemps et l'usage, la légalisation voire les bienfaits de cette plante suscitent débats et désaccords dans la société civile. Des thèses entières sont écrites sur le Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), le principe actif majeur de la

plante, et ses effets dus à l'interaction avec leurs récepteurs centraux appelés récepteurs cannabinoïdes ou CB (Bermudez-Silva et al., 2010). J'ai volontairement rangé les ECB dans les molécules à action satiétogène mais cet effet dépend de la dose de THC consommée : à faible dose, il entraîne une diminution de l'hyperphagie induite par la mise à jeun mais à forte dose, il entraîne une augmentation de l'hyperphagie due à la mise à jeun (Bellocchio et al., 2010).

Les CB connus sont au nombre de trois : CB1, CB2, et GPR55 découvert récemment (pour revue Li et al., 2011). Ces récepteurs ont, outre le ligand exogène qui est le THC, des ligands naturels appelés ECB qui sont actuellement au nombre de deux : l'anandamide (AEA) et l'arachidonoylglycerol (2-AG) (Bermudez-Silva et al., 2010 ; Li et al., 2011). Des études récentes ont montré qu'ils pouvaient être produits par les hépatocytes, le muscle strié, le tractus intestinal et le pancréas et les neurones (Di Marzo, 2009). Les CB présentent une conservation entre les espèces mais sont assez hétérogènes entre eux. Ils sont exprimés de façon très large dans l'organisme, la forme la plus abondante étant les CB1 dans le cerveau, nous allons nous concentrer particulièrement sur ce type de CB et sur son implication dans le contrôle de la prise alimentaire. Les CB1 sont exprimés dans le cervelet, le cortex et l'hippocampe (De Jesus et al., 2006) mais aussi, et de façon très intéressante, dans le cortex piriforme, l'amygdale, les noyaux thalamiques et hypothalamiques (Li et al., 2011) ainsi que la MO et le BO. Leur voie de signalisation classiquement décrite comprend un couplage avec une protéine G_i et leur activation entraîne l'inhibition de l'Adenylate Cyclase (AC) et une réduction des courants calciques entrant par des canaux calciques voltage-dépendants (pour revue Bermudez-Silva et al., 2010 ; Li et al., 2011) résultant en une diminution de la quantité de neurotransmetteurs libérée par effet autocrine présynaptique. Il semble que les ECB puissent être les effecteurs de molécules de signalisation de la balance énergétique puisque sans les ECB, la leptine (Pagotto et al., 2006) ou la ghréline (Kola et al., 2008) ne peuvent par exemple pas agir sur leurs cibles hypothalamiques.

2.4. Signalisation par les molécules anorexigènes

Les systèmes de 'coupe-faim' cérébraux sont nombreux, redondants et puissants comme s'il existait un danger réel à surconsommer de la nourriture et que le SNC était pourvu de plusieurs signaux 'stop'.

2.4.1. La leptine

Le souris ob/ob ont été découvertes en 1949 dans une colonie d'animaux consanguins dans le laboratoire Roscoe B. Jackson Memorial, et a été transféré à la souche de souris C57BL6. Les souris Ob/ob, que je décrirai plus en détail dans la deuxième grande partie de ce chapitre, sont obèses, hyperphagiques, et, avec le temps, deviennent hyperinsulinémiques et hyperglycémiques. Des

expériences de parabioses des années 1970, qui consiste à greffer 2 organismes l'un sur l'autre et à étudier l'influence réciproque de cette greffe, ont montré en utilisant des combinaisons de souris normales et ob/ob que ces dernières étaient incapables de produire un facteur circulant responsable de la satiété, mais qu'elles étaient très sensibles à ce même facteur produit par des souris normales. Il aura fallu attendre deux décennies supplémentaires pour qu'une étude de clonage révèle que le gène ob encode une hormone, la leptine, exprimée et sécrétée par le tissu adipeux (Zhang et al., 1994). L'année suivante, les injections de leptine recombinante ont démontré que le produit du gène ob permettait de réduire efficacement la masse corporelle. Simultanément, le produit du gène db, codant pour le récepteur de la leptine a été caractérisé et localisé au niveau cérébral. La découverte de la leptine a ainsi ouvert la voie à tout un champ d'étude sur la prise alimentaire, sur la régulation du métabolisme énergétique, et sur l'obésité (Lindström, 2007).

La leptine est une protéine de 16 kDa codée par le gène ob (Zhang et al., 1994) et synthétisée principalement par l'adipocyte. La quantité de tissu adipeux présent dans un organisme est un déterminant essentiel de la quantité de leptine produite (Ahima & Osei, 2004 ; Banks, 2004). D'autres lieux de synthèse existent dans l'organisme, l'épithélium gastrique et intestinal, le muscle squelettique strié et le placenta (Ahima & Osei, 2004) mais aussi, et de façon très intéressante, la MO (Baly et al., 2007). Ce peptide anorexigène peut franchir la barrière hémocéphalique et agir sur les structures centrales (Ahima & Osei, 2004; Banks, 2004; Schwartz et al., 2000) qui expriment deux isoformes majeures du récepteur à la leptine : i) la forme courte ObRa est dépourvue d'une partie de la région intracytoplasmique et induit l'activation partielle des voies de signalisation. Elle semble également impliquée dans le transport de la leptine à travers la barrière hémocéphalique. ii) la forme longue et active, notée ObRb. La liaison ObRb-leptine active principalement la voie des JAK/STAT. D'autres voies peuvent être aussi activées ou régulées par la leptine, par exemple la voie de signalisation de l'insuline IRS-1 (Insuline Receptor substrate 1), la voie des MAP kinases, AMP-kinase et IP3-kinase (Ahima and Osei, 2004). Ces voies mènent à des modifications de transcription génique, responsables notamment de la baisse de l'expression du NPY dans l'hypothalamus (Zac-Varghese, 2011). Différentes études montrent que certaines actions de la leptine, comme la modulation de l'excitabilité des neurones, sont trop rapides pour être attribuées à des activations de gènes (Ahima and Osei, 2004). Dans l'hypothalamus, la leptine hyperpolarise les neurones de l'aire hypothalamique latérale (Shiraishi et al., 1999) en activant des canaux potassiques KATP ATP-dépendants (Spanswick et al., 1997). Cette activation des canaux KATP a été révélée aussi dans d'autres types cellulaires en culture, comme la lignée de cellules CRI-G1 sécrétrices d'insuline (Harvey et al., 2000; Harvey et al., 1997). La leptine est aussi capable de dépolariser les neurones du noyau hypothalamique ventromédian (Shiraishi et al., 1999) ainsi que les cellules du noyau paraventriculaire (Powis et al., 1998) et induire ainsi une action anorexigène puissante. Elle est également impliquée dans des fonctions somatotropes

en lien avec l'axe hypophysaire et participe ainsi à la mise en place de divers tissus (hématopoïèse, angiogenèse...) pendant le développement (revue de (Harrold, 2004)). En particulier, la leptine est liée aux mécanismes de la puberté. Cette hormone exerce de plus une action neurotrophe incluant la modulation du guidage axonal ou de la plasticité synaptique. Je reviendrai sur les modèles d'obésité dépendant de la leptine et sur la régulation leptinergique des fonctions olfactives dans la 2ème partie de ce chapitre.

2.4.2 L'insuline

C'est un peptide dont l'implication dans la prise alimentaire est connue depuis les années 1950 (Le Magnen, 1956, 1999a, 1999b, 2001; Le Magnen & Julien, 1999a, 1999b). Depuis, un nombre impressionnant de résultats, d'implications dans différents systèmes centraux et périphériques ont été publiés (pour revue Gerozissis, 2008). L'insuline est sécrétée par les cellules bêta des îlots de Langerhans pancréatiques et est impliquée notamment dans la régulation métabolique périphérique et la régulation de la prise alimentaire ; de manière très intéressante, elle est également exprimée au niveau de la MO (Lacroix et al., 2008). Elle est en premier lieu synthétisée sous une forme immature, en tant que prépro-insuline, puis transformée en pro-insuline suite à la formation de ponts disulfures pour finalement circuler sous sa forme finale après un clivage par protéases. Bien que le glucose soit le principal facteur responsable de la sécrétion d'insuline (Le Magnen & Julien, 1999a; Suzuki et al., 2010), les acides gras, les corps cétoniques et les acides aminés peuvent également stimuler sa sécrétion de façon directe ou indirecte, en modifiant les quantités circulantes d'hormones, de peptides régulateurs ou encore de neurotransmetteurs (Gerozissis, 2008). Des réactions complexes mais fonctionnelles dès les premiers instants de la vie permettent de dépolariser les cellules bêta en présence d'un fort taux d'ATP lié à un fort taux de glucose via des canaux potassiques sensibles à l'ATP : cette dépolarisation cause la libération de l'insuline dans le sang (Szollosi et al., 2007 pour revue Drews et al., 2010). Elle traverse la barrière hématoencéphalique de manière saturable (Suzuki et al., 2010) suggérant qu'elle le fait par la voie de transporteurs. Ce peptide a deux types de récepteurs aux affinités différentes, IR.A dans le système nerveux et IR.B dans les organes périphériques (Whittaker et al., 2002), ces 2 formes étant étonnamment exprimées dans le système olfactif (Lacroix et al., 2008). L'insuline ainsi libérée agit, en périphérie, principalement sur le foie et les muscles et favorise le stockage du glucose sous forme de glycogène dans le muscle, le foie et le tissu adipeux en stimulant la lipogenèse. Ses taux varient principalement en fonction des repas, ce qui lui conférerait à la fois une action orexigène puis anorexigène : elle est libérée de façon faible mais continue dans l'organisme avec un pic préprandial d'une dizaine de minutes juste avant les repas (Powley & Berthoud, 1985 ; Le Magnen, 2001) qui servirait de signal orexigène. ainsi l'administration

d'insuline chez des rats à jeun augmente leur sensation de faim et leur consommation alimentaire (Le Magnen & Julien, 1999a ; Powley & Berthoud, 1985). Après les repas, on observe la présence d'un pic plus long (environ une heure) qui correspond à un effet anorexigène de l'insuline semblable à l'action de la leptine (Woods and D'Alessio, 2008). Il a été montré que l'insuline abaisse la réponse des neurones olfactifs à un signal odorant (Lacroix et al., 2008 ; Savigner et al., 2009) mais je reviendrai sur ces effets plus longuement dans le chapitre III de cette introduction.

2.4.3. La cholécystokinine

La CCK est l'exemple prototypique des hormones de satiété sécrétées par le tractus gastro-intestinal. Elle est sécrétée lorsque de la nourriture riche en lipides et en protéines atteint le duodénum et le jejunum (Lin and Chey, 2003). Elle est alors libérée dans le sang et influence la motilité du tractus gastro-intestinal, la sécrétion d'enzymes de digestion et la sécrétion d'acide gastrique. La CCK diffuse localement pour stimuler les récepteurs CCKA et CCKB situés sur les terminaisons vagales qui innervent le tronc cérébral. Elle peut également traverser la barrière hématoencéphalique pour agir au niveau de récepteurs centraux localisés dans le tronc cérébral et l'hypothalamus et induire une diminution de la prise alimentaire (Woods and D'Alessio, 2008). Le taux de cholecystokinine augmente à la fin des repas et reste élevé pendant plusieurs heures. L'administration d'un antagoniste des récepteurs CCKA conduit à une durée d'ingestion plus longue et une prise de calories plus importante. La CCK est donc un facteur de satiété : son administration exogène contribue à diminuer la taille d'un repas une fois qu'il a été initié (Gutzwiller et al., 2004).

3. L'obésité

L'obésité touche toutes les classes sociales et tous les pays du monde même si les prévalences sont supérieures chez les plus pauvres. Les régimes alimentaires changent en même temps que les revenus dans les pays en voie de développement, et il existe une transition de la consommation de céréales et de tubercules vers la viande, la graisse, les sucres, mais aussi les fruits et les légumes. Contrairement aux idées reçues, le mode de consommation occidental, et les excès dont il est coutumier n'impacte pas seulement les classes sociales défavorisées, mais bel et bien les classes moyennes et les milieux riches. Par exemple, en Chine, depuis l'apparition de la nourriture occidentale, l'obésité a explosé dans les milieux les plus aisés. Cette surconsommation va également de pair avec un mode de vie de plus en plus sédentaire. Dans les pays en voie de développement, la proportion de personnes obèses ou en surpoids a triplé de 1980 à 2008, et a quasiment doublé dans les

pays à hauts revenus (Stevens et al., 2012). Malheureusement, il est aujourd'hui impossible d'ignorer que l'obésité, avec une consommation excessive de sels, de gras et sucres est liée à l'augmentation de l'incidence de maladies dévastatrices comme cancer, diabète, maladies cardiovasculaires et accidents vasculaires cérébraux (AVC). Par ailleurs, l'obésité se caractérise par un excès de consommation de nourriture de qualité déséquilibrée : les obèses souffrent de dénutrition avec une chute des sels minéraux et des vitamines ingérées, ce qui fragilise tout l'organisme.

Chez des personnes qui ont un rapport à la nourriture totalement désorganisé, l'éducation alimentaire est primordiale et le lien à l'aliment doit être expliqué, en particulier aux enfants, pour qu'ils améliorent leurs régimes alimentaires et augmentent leur activité physique à titre préventif. Il est toutefois difficile d'appliquer des recommandations globales puisque les régimes alimentaires varient selon la disponibilité des revenus, des préférences culturelles, des denrées... Un dossier très complet sur les habitudes alimentaires de différentes populations, leur impact sur la santé, la façon dont elles pourraient être influencées par des données économiques, et la manière dont l'agriculture et les politiques de santé publiques pourraient être amenées à s'y adapter et évoluer, est disponible sur internet (<http://www.odi.org/future-diets>).

L'épidémie d'obésité ne peut pas simplement être expliquée par la transformation des modes de vie et de la modification de données économiques, pas plus qu'elle ne peut être endiguée simplement par un mode de vie sain, davantage de sport et des politiques sociales adaptées, surtout quand la personne est déjà obèse. De multiples facteurs, incluant de façon non exhaustive des facteurs génétiques, psychosociaux, environnementaux ou encore pharmacologiques contribuent de façon significative à l'obésité et font l'objet d'études très détaillées (McAllister et al., 2009). Dans ce contexte, il est nécessaire de disposer de très nombreux modèles d'animaux obèses pour apporter des preuves expérimentales spécifiques avec l'étude des causes hypothétiques de l'obésité, qu'elles soient métaboliques et/ou cérébrales, et de leur traitement, et pouvoir éventuellement les transposer à l'Homme. Pour ma part, je ne décrirai ici que quelques-uns de ces modèles, les plus utilisés et les plus proches de la thématique de recherche de cette thèse, mais une liste complète de ces modèles est dressée par plusieurs revues (Kanasaki and Koya, 2011; Lutz and Woods, 2012; Nilsson et al., 2012).

3.1 Les modèles de l'obésité chez les rongeurs

3.1.1 Les modèles monogéniques

Je décrirai principalement les modèles monogéniques de rongeurs majoritairement dépendant de la leptine (à l'exception des MCR4-KO que je décris en fin de chapitre), d'une part puisque ce sont les mieux décrits dans la littérature, et d'autre part puisque j'ai moi-même utilisé de façon extensive le modèle ob/ob. Ce sont des modèles dans lesquels un seul gène est absent ou déficient puisque les animaux avec un défaut de la signalisation leptinergique dans l'hypothalamus développent rapidement un phénotype obèse morbide.

Souris ob/ob

Comme indiqué plus tôt dans le chapitre, une mutation spontanée est à l'origine du phénotype obèse marqué des souris ob/ob, identifié par Coleman (1978). Ce n'est que lorsque le produit du gène muté, la leptine, a été identifié par Zhang et al. (1994) que les travaux sur les origines génétiques de l'obésité ont débuté. Phénotypiquement, l'absence de leptine conduit à une obésité marquée et précoce caractérisée par une hyperphagie, une dépense énergétique réduite et une hypothermie, ainsi que d'autres effets secondaires incluant l'hypercorticotéronémie, une résistance à l'insuline associée à de l'hyperglycémie et de l'hyperinsulinémie, un hypothyroïdisme et un déficit d'hormone de croissance. Ces souris sont également stériles. L'obésité des souris ob/ob est une des rares formes d'obésité à pouvoir être traitée par une administration exogène de leptine, qui, par injection répétée, rétablit tous les défauts phénotypiques constatés. La déficience en leptine a été observée dans de rares cas d'obésité humaine (O'Rahilly, 2009)

Souris db/db

Les souris db/db ont un phénotype similaire aux ob/ob : elles sont hyperphagiques, ont une dépense énergétique réduite conduisant à une obésité marquée et précoce, sont hypothermiques et ont également une déficience en hormone de croissance. Cependant, certaines d'entre elles présentent une hyperglycémie encore plus marquée que les ob/ob, et bien qu'elles soient capables de sécréter de la leptine, elles ne possèdent toutefois pas de récepteur Ob-R fonctionnel. Ces souris sont insulino-résistantes et développent un phénotype partiel de diabète de type II, ce qui leur a valu d'être fréquemment utilisées pour l'étude des syndromes similaires à cette maladie. Comme pour les ob/ob, cette mutation du récepteur à la leptine peut être trouvée chez l'Homme, mais elle est extrêmement rare.

Rats Zucker, ZDF et Koletsky.

De façon analogue aux souris db/db, plusieurs modèles de rats leptino-résistants ont une mutation sur le gène du récepteur Ob-R. Les rats obèses Zucker (fa/fa ou « fatty ») et les rats Koletsky portent des formes mutées du domaine extra-cellulaire du récepteur à la leptine. Ils développent un phénotype similaire d'hyperphagie et de dépense énergétique réduite, conduisant à une obésité morbide. Ces rats ont une tolérance réduite au glucose, un déficit de croissance potentiellement lié à l'activité de l'axe gonadotrope (GH/IGF-1), un hypothyroïdisme ainsi qu'une fertilité réduite.

Les rats Koletsky ont une mutation qui abolit l'expression de l'ARNm du récepteur à la leptine (Friedman, 1998). A l'opposé, la mutation fa/fa des rats Zucker est associée à un défaut de transport du récepteur à la leptine : l'hormone est bien produite mais est retenue dans le compartiment intracellulaire. Les cellules des rats Zucker expriment bien le récepteur à leur surface mais leur nombre est très réduit et diminue de fait la détection de leptine et la transduction du signal. Par rapport au rats Zucker, les rats Koletsky présentent une hypertension artérielle et un phénotype plus sévère d'insulino-résistance.

Les rats ZDF (Zucker Diabetic Fatty) sont dérivés d'une souche de rats Zucker présentant une dérégulation précoce du métabolisme du glucose. Les rats ZDF développent rapidement des diabètes lorsqu'ils reçoivent un régime gras (High-fat Diet, HFD), et une partie de leur propension à développer des diabètes précoces serait liée à une expression altérée du transporteur de glucose dans le muscle squelettique (Zierath et al., 1998).

Souris MC4R-KO

La voie dépendante de la leptine, n'est pas directement impactée dans ce modèle, mais il reste malgré tout très utilisé dans différentes études. L' α -MSH et l'AgRP influencent l'homéostasie énergétique à travers leur action sur les récepteurs MC. En particulier, le sous-type MC4 est impliqué dans le contrôle de la prise alimentaire. Une inactivation spécifique de MC4 par une souris transgénique déficiente en MC4R induit une hyperphagie et une obésité morbide (Huszar et al., 1997). Les souris MC4R-KO sont également hyperinsulinémiques, hyperglycémiques et hyperleptinémiques. Par contraste avec d'autres modèles d'obésité, ces souris n'ont pas de taux de corticostérone circulants très élevés. Les souris MC4R-KO sont insensibles à la leptine, à l' α -MSH et à l'AgRP. Des mutations similaires des récepteurs MC4 chez l'Homme sont souvent citées comme étant la cause d'obésité d'origine génétique la plus fréquente.

Un modèle de rat MC4R-KO a également été décrit par Mul et al. (2012) : même s'il possède beaucoup de caractéristiques en commun avec son homologue murin, il existe des différences, notamment dans l'hypothalamus, où chez la souris MC4R-KO, il existe une expression augmentée de NPY mais pas de POMC, alors qu'à l'inverse, le rat MC4R-KO exprime plus de POMC, alors que le niveau d'expression du NPY reste inchangé.

3.1.2 Les modèles DIO (Diet-Induced Obesity)

Les modèles DIO reflètent bien la majorité des cas d'obésité observés chez l'Homme (c'est-à-dire d'origine non génétique, mais induite par l'alimentation) par rapport aux modèles génétiquement modifiés et constituent de fait une cible privilégiée pour différents essais thérapeutiques. Ils constituent également des modèles d'obésité qui ne sont pas purement dépendant du système leptinergique mais d'origine plurifactorielle. Différentes souches de souris répondent différemment aux régimes gras HFD proposés. Les souris C57BL/6/J, que j'ai utilisées pendant ma thèse, sont très prisées pour les études DIO puisqu'elles développent un phénotype similaire au syndrome métabolique humain lorsqu'elles sont nourries avec un régime HFD (obésité, hyperinsulinémie, insuline-résistance) (Collins et al., 2004). De façon intéressante, au sein de la famille C57, certaines souches peuvent se montrer très résistantes au HFD et ne développer que peu ou pas de phénotype malade, comme la souche C57BL/Ksj. Chez le rat, les souches Sprague Dawley ou Long Evans sont fréquemment utilisées pour ce type d'études. La manipulation des différents éléments constitutifs du régime peut restaurer en partie un phénotype obèse chez ces modèles, même en cas de poursuite du régime HFD.

3.2 L'impact de l'obésité sur l'homéostasie énergétique

Les hormones et les différents peptides impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique et la prise alimentaire sont impactés par l'obésité. Je décrirai ici les symptômes et perturbations majeurs décrits dans la revue de Crespo et al. (2014), en me concentrant de nouveau sur les molécules impliquées dans des interactions entre homéostasie énergétique et système olfactif.

Bien que le rôle de la ghréline dans l'étiologie de l'obésité soit encore mal compris, elle est considérée comme une cible vitale de par sa capacité à induire un état positif de la balance énergétique. Des études ont montré que l'absence de ghréline ou de son récepteur GHS-1a protégeait les souris contre les effets d'un régime HFD (Wortley et al., 2005; Zigman et al., 2005). Par ailleurs, une immunisation à la ghréline chez des rats a permis de réduire la prise de poids, alors que des anticorps anti-ghréline injectés chez des souris réduisent la consommation alimentaire après une période de jeun de 24h et permettent le maintien d'une dépense énergétique élevée (Mayorov et al., 2008). Néanmoins, l'absence de ghréline chez des animaux ob/ob ne semble pas diminuer la prise alimentaire ou le gain de poids, malgré une légère réduction de la glycémie.

En ce qui concerne la leptine, les mutations de son récepteur induisent une obésité chez l'Homme comme chez l'animal. Chez un individu obèse, le transport de la leptine à travers la barrière

hémato-encéphalique est défectueux, ce qui suggère une résistance du SNC à la leptine. Cette résistance pourrait également être associée à des anomalies de signalisation leptinergique (Morton et al., 2006). L'insuline est un signal de satiété et d'obésité (Schwartz and Porte, 2005). Une expression réduite ou la délétion de récepteurs à l'insuline dans le cerveau conduit à une hyperphagie et une obésité (Kuliczowska-Plaksej et al., 2012).

Dans de nombreux cas d'obésité, les taux de glucocorticoïdes circulant sont très élevés, et exercent un effet orexigène par inhibition du CRH et stimulation de l'expression du NPY (Kyrou et al., 2006). Il a été également montré que chez des patients obèses, l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien répondait plus efficacement à différents stimuli (Pasquali et al., 2006).

Enfin, il faut préciser qu'il n'existe pas de modèle d'obésité chez le rongeur basé sur la manipulation génétique des récepteurs à l'insuline.

Chapitre III : Interactions olfacto-alimentaires et problématique de la thèse

Dès la fin des années 1950 trois modalités sensorielles sont mises en évidence concernant le choix des aliments : les sens chimiques, de loin les plus puissants (Rolls, 2005), puis la texture estimée dans la cavité buccale par le nerf trigéminal et la vision (Le Magnen and Julien, 1999b). La combinaison des systèmes gustatif, olfactif (ortho- et rétro- nasal) et trigéminal est extrêmement importante puisqu'elle définit, après intégration corticale, la flaveur d'un aliment mis en bouche. Jacques Le Magnen est le premier à mettre en évidence l'implication du système olfactif dans la prise alimentaire (pour revue, Le Magnen, 2001). Ainsi, des aliments énergétiquement identiques mais qui diffèrent au moins par une caractéristique sensorielle sont consommés en quantité différente. La modalité sensorielle qui a le plus d'impact pour orienter le choix de l'animal dans ce contexte est l'olfaction (Le Magnen, 1999c). Les rats auxquels leur aliment habituel est présenté avec une nouvelle odorisation augmentent leur prise alimentaire de 43%. Le Magnen a alors odorisé le même aliment successivement avec quatre odeurs différentes et a présenté chaque aliment odorisé pendant 30 minutes, aboutissant à des quantités ingérées cumulées de 72%. L'apparition de nouveaux stimuli olfactifs inhibe donc le signal de satiété et conduit l'animal à consommer plus que ses besoins physiologiques (Le Magnen, 1999a,b). Le numéro 1 du volume 33 de la revue *Appetite* parue en 1999 fait le point sur les publications de Le Magnen parue en français.

L'olfaction intervient comme indicateur de la valeur qualitative des aliments (valeur hédonique), induisant des préférences liées au plaisir (Le Magnen, 1999c). Elle peut être utilisée aussi comme indicateur de la valeur énergétique de l'aliment suite à une association (Le Magnen, 1999c). De plus, il existe une notion de satiété sensorielle spécifique : après avoir été nourri a satiété avec un aliment, la réponse neuronale vis-à-vis de la flaveur de cet aliment spécifique diminue, mais pas pour d'autres aliments (pour revue Le Magnen, 2001 ; Rolls, 2005). Cette satiété sensorielle se manifeste notamment au niveau du cortex orbitofrontal où la valeur de plaisir lié à l'odeur est représentée (Rolls, 2005) : par exemple les réponses à l'odeur de banane sont diminuées après une consommation de banane (O'Doherty et al., 2000). C'est un processus différent de l'habituation, qui est un mécanisme purement olfactif intervenant dans les premières étapes du codage olfactif, au niveau de la muqueuse et du BO, indépendamment de processus mnésiques et/ou hédoniques.

A la suite de Le Magnen, Peger s'est attachée à tester l'influence du statut alimentaire et de la palatabilité des aliments sur la réponse des M/TC du BO. Il s'avère que les M/TC, chez un rat affamé, répondent mieux aux odeurs à valeur alimentaire (palatables), qu'aux odeurs neutres, tandis que chez le rat rassasié, cette différence de réactivité disparaît (Peger et al., 1972). Cette palatabilité peut être induite en habituant l'animal à l'aliment odorisé. L'auteur démontre ainsi qu'une odeur associée à un aliment peut acquérir une « valeur alimentaire » ainsi que la capacité d'activer plus fortement les M/TC (Peger, 1974). En plus de ces fonctions sensorielles, de récentes avancées suggèrent que le système olfactif est intimement lié au système endocrine qui régule la balance énergétique (pour revue

(Palouzier-paulignan et al., 2012). Ainsi, durant les cycles de prise alimentaire, ou lors des désordres métaboliques que j'ai évoqué au chapitre précédent, l'olfaction est modulée en réponse aux niveaux changeants de nombreuses molécules (en périphérie, ghréline, insuline, leptine et CCK..., dans le SNC, orexines, NPY...). En plus d'être un senseur de la valeur énergétique et de la palatabilité des aliments, le système olfactif serait donc également un senseur chimique de l'état énergétique de l'organisme et de l'état nutritionnel. Je décrirai dans ce chapitre les mécanismes d'interaction bidirectionnelle entre système olfactif et systèmes régulateurs du métabolisme énergétique et l'influence de l'état nutritionnel de l'organisme sur la perception olfactive.

1. Données sur les systèmes orexigènes et anorexigènes dans le système olfactif : synthèse locale et localisation des récepteurs

Le statut nutritionnel d'un individu influence sa capacité à détecter des odeurs. De manière générale, le jeûne facilite la détection des odeurs, en particulier celles associées à un aliment, alors que la satiété vis-à-vis d'un aliment particulier réduit la capacité à détecter l'odeur spécifiquement associée à cet aliment (O'Doherty et al., 2000; Mulligan et al., 2002). Les peptides du métabolisme énergétique et les hormones que j'ai décrits dans le chapitre II, qui sont responsables des mécanismes cellulaires qui sous-tendent faim et satiété, ont de nombreux récepteurs dans différentes parties du système olfactif, dès ses premiers étages, dans la MO et le BO (figure 1.11).

1.1. Systèmes orexigènes

Ghréline. Le récepteur de la ghréline GHSR-1a est présent dans la GL, la MCL et la GCL du BO (Tong et al., 2011). Dans le même article, les auteurs montrent l'importance de la ghréline pour la régulation de l'aversion olfactive conditionnée chez le rongeur et pour la modulation du flairage à la fois chez le rongeur et l'humain.

ECB. Le récepteur aux endocannabinoïdes CB1, impliqué dans la régulation de l'appétit et la consommation d'aliments palatables, est régulé en partie par la leptine (Di Marzo, 2009) et est présent dans les cellules de soutien de la MO dans l'AON (Hermann and Lutz, 2005). Il sont également présents en grand nombre sur les fibres centrifuges au BO (Soria-Gomez et al., 2014). Dans le BO, l'injection locale d'un agoniste des récepteurs CB1 diminue l'hyperphagie qui suit une mise à jeun de 24h chez la souris (Soria-Gomez et al., 2014). Elle diminue également l'habituation comportementale induite par présentation répétée d'une odeur à la souris. Ces souris explorent davantage les odeurs. Il a été démontré dans cet article auquel notre équipe a participé que les CB1 régulent l'activité des

terminaisons des fibres centrifuges, sans que l'on ait déterminé pour l'instant le signal qui enclenche la synthèse accrue d'anandamide dans le BO en réponse à la mise à jeun. Une hypothèse serait que les CB1 servent de médiateur de l'action de la leptine, de façon comparable à l'hypothalamus (Cardinal et al., 2014).

NPY. C'est un neuropeptide qui est présent à la fois dans le BO et la MO. Au niveau de cette dernière, on trouve du marquage NPY au niveau des cils des OSN, dans les cellules de soutien et dans les cellules engainantes. Il existe également un faible marquage au niveau du corps cellulaire des OSNs. Dans le BO, le NPY est localisé de façon éparse sur les corps cellulaires des neurones mais aussi sur les cellules engainantes de la GL (Jia and Hegg, 2010). Les fibres à NPY qui projettent sur le BO proviendraient du locus coeruleus (Bouna et al., 1994) ou plus probablement de l'hypothalamus, mais il n'existe pas de données précises sur les connexions hypothalamo-bulbaires. Il est intéressant de noter que (i) le NPY augmente les réponses en EOG aux odeurs chez les rats à jeun (Negroni et al., 2012) et (ii) la suppression par KO d'un des récepteurs du NPY, Y1, conduit à un déficit modéré mais spécifique des fonctions olfactives (Doyle et al., 2008). Les auteurs suggèrent que le NPY pourrait être un facteur neuroprolifératif essentiel pour la MO et des études plus poussées pourront dans le futur déterminer avec précision l'action de ce neuropeptide anorexigène dans la MO et le BO.

Orexines. Les récepteurs aux orexines sont fortement exprimés par les M/TC (Caillol et al., 2003).

1.2. Systèmes anorexigènes

Insuline. Il existe un débat dans la littérature concernant les synthèses locales d'insuline et de leptine dans la MO et le BO. La controverse concerne particulièrement les faibles niveaux de présence d'insuline dans le cerveau et les quantités d'insuline détectées dans la MO qui proviendraient de la circulation périphérique irriguant fortement tout l'épithélium nasal (Urayama and Banks, 2008). Toutefois, la manière dont l'hormone est transportée du sang vers la MO n'est pas totalement comprise. En revanche, pour ce qui est du BO, l'insuline est transportée à travers la barrière hématoencéphalique, via un transport saturable. Il convient de noter qu'elle est transportée vers le BO bien plus rapidement que vers toute autre région du cerveau et que le BO est la région cérébrale à la plus forte concentration en insuline, et où ses récepteurs sont répartis de manière extrêmement dense (Banks et al., 1999; Lacroix et al., 2008). Il est également à noter aussi que la barrière hématoencéphalique est très perméable au niveau du BO (Ueno et al., 1996). Des données obtenues à l'INRA de Jouy (Lacroix et al., 2008) indiquent l'existence d'une source locale d'insuline au sein de la MO : des facteurs de transcription codants pour l'insuline (Pdx1) ainsi que des convertases impliquées

dans la maturation des précurseurs de l'insuline (voir chapitre II) sont présents dans la MO et suggèrent l'existence d'une transcription locale, qui serait également possible dans le BO.

Mais, malgré les doutes qui subsistent sur la production locale et les voies d'entrées de cette hormone dans le BO et la MO, la densité de récepteurs à l'insuline (IR) ne peut, elle, être mise en doute : l'immunolocalisation a permis de visualiser une forte densité d'IR dans le BO ainsi qu'au niveau du cortex olfactif et du système limbique comme par exemple l'AON, le PC, le TO, ou le CE (Unger et al., 1989). En somme, la plus grande affinité de fixation de l'insuline sur son récepteur IR, la plus grande densité de récepteur IR et la plus grande activité IR-kinase dans le cerveau sont observables au niveau du BO, confirmant que la signalisation IR est active dès les premières étapes de la détection des odeurs et de la transduction de l'information olfactive. Plus précisément, dans le BO, les IR sont exprimés dans des zones dendritiques riches en synapses, comme l'EPL, et de façon plus faible dans la couche GL (Lacroix et al., 2008; Marks et al., 2009), GCL et MCL.

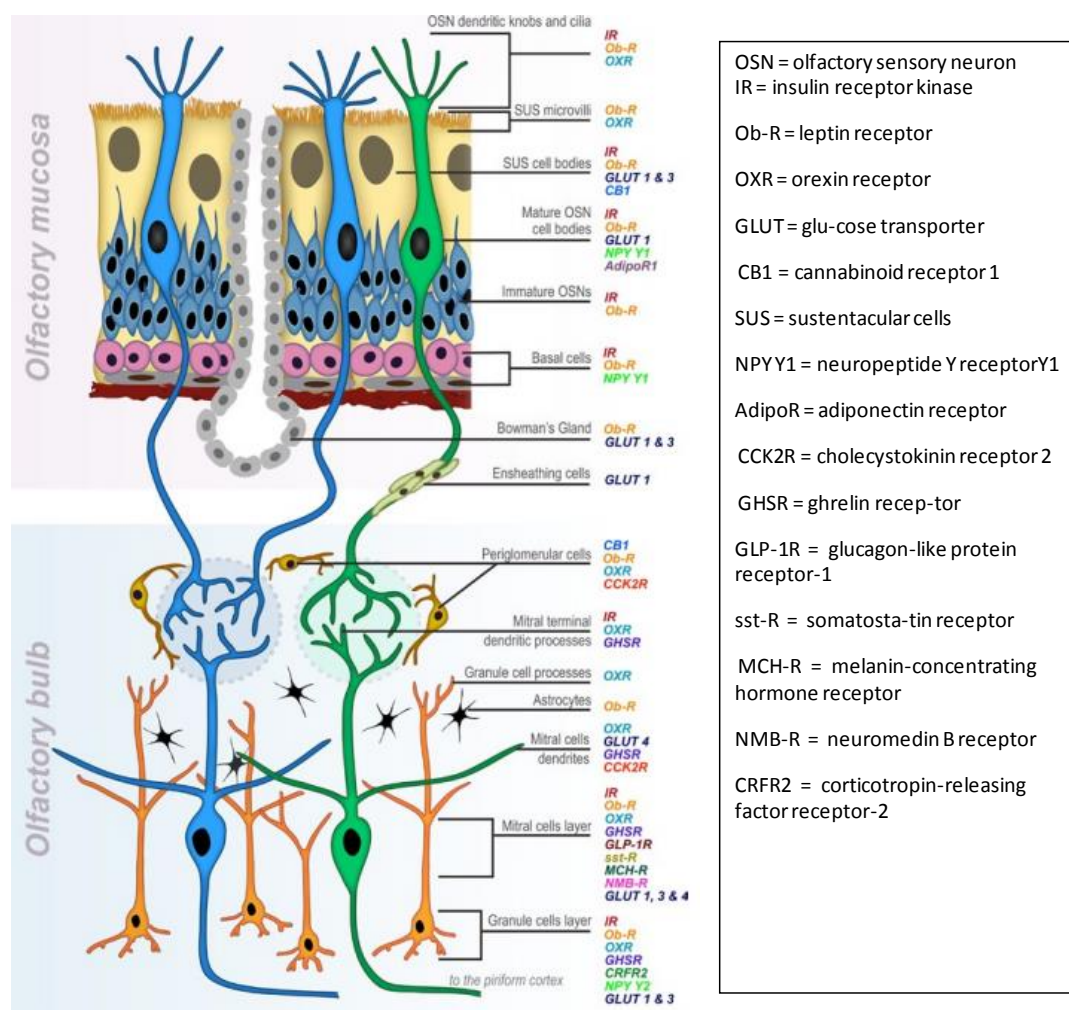


Figure 1.11 Représentation schématique de l'expression des récepteurs aux facteurs majeurs du métabolisme au sein du système olfactif. La partie supérieure du schéma indique la distribution cellulaire et

subcellulaire de divers récepteurs dans la MO (olfactory mucosa). La partie inférieure indique la même chose au sein du BO (olfactory bulb). Figure modifiée de Palouzier-paulignan et al. (2012).

Leptine. Elle est « l'autre hormone anorexigène » et serait aussi produite en petite quantité à la fois dans la MO (Morash et al., 1999; Baly et al., 2007) et dans le BO. Les Ob-R (les deux isoformes) sont assez largement observés dans les aires olfactives, comme dans le LOT (Elmqvist et al., 1998), le PC (Getchell et al., 2006b) ou le BO (Prud'homme et al., 2009). Dans la MO, les Ob-R sont observés au niveau des boutons dendritiques d'OSN matures à la surface de l'épithélium et en quantité moindre au niveau d'OSN immatures. On trouve également ces récepteurs sur les cellules de soutien et des glandes de Bowman (Getchell et al., 2006). Enfin, certaines cellules de la muqueuse sécrétrice d'OBP sont également sensibles à la leptine (Badonnel et al., 2009).

La CCK est un des neuropeptides les plus abondants dans le cerveau. Après avoir franchi la barrière hémato encéphalique, elle est détectée au niveau du tronc cérébral, de l'hypothalamus, mais aussi du BO, de l'AON, des tubercules olfactifs et du PC (Gutiérrez-Mecinas et al., 2005). Dans le BO, la CCK est détectée dans toutes les couches neuronales excepté celle de l'ONL. De fortes concentrations de CCK ont également été détectées dans les tubercules olfactifs. Les récepteurs du CCK sont répartis dans le cortex olfactif, et le CCK2R est notamment présent dans l'AON et le PC (Honda et al., 1993). Dans le BO, CCK2R est spécifiquement présent au niveau de l'IPL et dans les MC et les cellules juxtaglomérulaires (Ma et al., 2013).

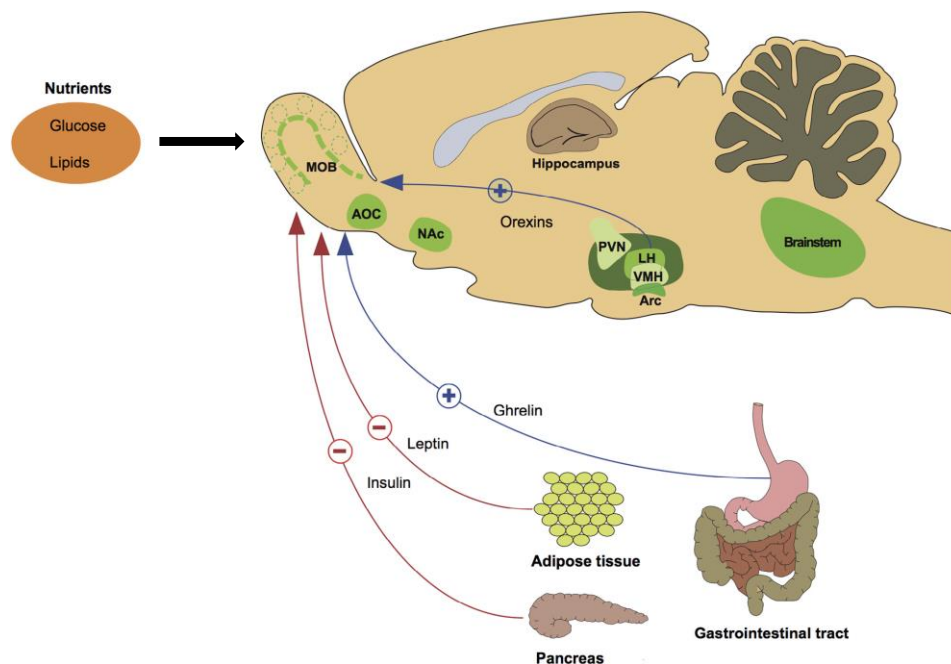


Figure 1.12 Modulation du BO par voie hormonale et nutritive. Les molécules orexigènes produites centralement et en périphérie (les orexines et la ghréline, respectivement), améliorent la sensibilité olfactive, alors que les signaux anorexigènes, comme la leptine ou l'insuline ont un effet global inhibiteur sur la perception

olfactive. Les métabolismes glucidique et lipidique pourraient être sondés par les circuits olfactifs par l'activité des transporteurs de glucose et des canaux potassiques sur les MC, ce qui modifierait en retour les processus olfactifs par la régulation des informations efférentes au BO. Figure extraite de (Soria-Gomez et al., 2014). La liste des abréviations est contenue dans le texte.

2. Interactions olfacto-alimentaires : études fonctionnelles

Au sein du système sensoriel, le BO serait une structure centrale sous influence du statut nutritionnel et capable de contrôler la prise alimentaire. Une bulbectomie totale induit la disparition du sens olfactif et une hyperphagie chez l'animal (Miro et al., 1982). Les cellules du BO expriment des récepteurs aux orexines et à la leptine (Prud'Homme et al., 2009), des récepteurs aux ECB (Bermudez-Silva et al., 2010 ; Li et al., 2011) ainsi que des récepteurs à l'insuline (Colley et al., 2004) et au NPY. Ces molécules ont un effet sur les neurones bulbaire : ainsi l'orexine module l'activité des MT/C dans des tranches de BO de rat (Hardy et al., 2005) et chez des rats à jeun, les antagonistes de l'orexine ou la leptine diminuent l'activité c-fos des neurones bulbaire de toutes les couches du BO, exception faite en condition spontanée (Prud'Homme et al., 2009), où l'injection de c-fos chez les rats à jeun augmente l'activité des MC et GC (Prud'Homme et al., 2009, figure 6 C). De plus, après une consommation de nourriture palatable, les taux de CCK, signal périphérique impliqué dans le contrôle à court terme de la prise alimentaire, augmentent dans le BO, principalement au niveau de la couche GCL (Martin et al., 2009). Enfin, des données récentes pointent également une implication des CB dans le contrôle de la sensibilité olfactive chez le Xénope (Breunig et al., 2010; Czesnik et al., 2007).

Ces données sur les interactions BO/prise alimentaire convergent sur le fait que le BO est partie prenante du réseau de structures cérébrales impliqué dans les mécanismes centraux de régulation de la prise alimentaire. Si le BO est impliqué dans le réseau des structures modulant la prise alimentaire, non seulement sa lésion ou son inactivation devrait la perturber mais, en retour, il devrait présenter une plasticité spécifique liée à l'état nutritionnel. Nous voulons résumer ici les données fonctionnelles montrant cette régulation bidirectionnelle dans le système olfactif, préciser les questions essentielles qui restent à être résolues pour comprendre cette interaction complexe au niveau du BO, et, pour terminer l'introduction, exposer le sujet de cette thèse.

2.1. Interactions entre état nutritionnel et perception olfactive : études comportementales

Nous avons vu précédemment les données de Le Magnen et de Soria-Gomez sur l'implication du système olfactif dans l'induction de la prise alimentaire chez le rongeur. Chez l'humain, les stimuli

sensoriels, notamment chimiques, sont largement impliqués dans la régulation centrale de la prise alimentaire, consistant à préparer l'organisme à recevoir des aliments pendant la phase céphalique (pour revue Mattes, 1997). Chez certains patients (nourrissons et personnes très âgées) atteints de troubles neurologiques accompagnés par des désordres de la prise alimentaire obligeant à utiliser une nutrition entérique, la stimulation des voies olfactives par de l'huile de poivre noir est un moyen efficace pour reverser l'anorexie en permettant à nouveau une prise par voie orale (Munakata et al., 2008).

A l'inverse, l'hypothèse d'une modulation du statut nutritionnel sur la perception des odeurs a été également étudiée. S'il est expérimenté de tous que la perception des odeurs est différente lorsque l'on est à jeun ou suite à un bon repas, les travaux anciens de Cabanac chez l'homme montrent que la valeur hédonique d'un aliment change selon l'état nutritionnel, ce qu'on qualifie d'alliesthésie (Cabanac and Duclaux, 1973). Des études plus récentes montrent que la valeur hédonique d'une odeur alimentaire est plus importante dans l'état affamé que l'état rassasié alors que la valeur hédonique d'une odeur non alimentaire semble augmenter avec la satiété (Jiang et al., 2008). Des résultats plus récents confirment que les signaux du statut nutritionnel modulent le comportement et la perception olfactifs. Ainsi, des travaux montrent que l'exploration d'une odeur alimentaire est augmentée en cas de jeûne de 48 heures chez les rats (Prud'Homme et al., 2009). De plus, en 2006, Getchell et al. ont montré que les souris obèses déficientes en leptine de la souche Ob/Ob ont de meilleures performances olfactives pour trouver leur nourriture que les souris sauvages, suggérant que la leptine aurait pour rôle de diminuer le seuil de la perception olfactive. Ils montrent dans ce sens qu'une injection de leptine réduit les performances olfactives de ces souris (Getchell et al., 2006). Karine Julliard au CNRL (Lyon) a publié plusieurs articles en se basant sur la tâche d'aversion olfactive conditionnée où les rats apprennent à éviter une odeur d'acétate d'isoamyl mélangée à leur eau de boisson parce qu'elle a été préalablement associée à un malaise gastrique induit par injection de chlorure de lithium. Les rats à jeun pendant 22 heures détectent et évitent cette odeur aversive à de plus faibles concentrations que les rats nourris suggérant que le seuil de détection d'une odeur non alimentaire mais associée à une aversion est abaissée par le jeûne (Aimé et al., 2007). Au cours de sa thèse dans le laboratoire IMNC en collaboration avec l'INRA de Jouy, Mounir Bendahmane a également montré une baisse du seuil d'apparition des réponses spatiotemporelles enregistrées dans le BO chez des rats à jeun comparés à des rats nourris, que ce soit en réponse à une odeur alimentaire ou à une odeur neutre.

Il apparaît donc que les molécules de signalisation du statut nutritionnel peuvent agir sur le système olfactif en augmentant la sensibilité olfactive pendant le jeûne et en la diminuant pendant les périodes de satiété. Des études à l'INRA de Jouy et au CNRL se sont également intéressées aux orexines et à la leptine. Des tests comportementaux utilisant ces signaux moléculaires clés ont été réalisés dans ce sens et ont montré que les performances olfactives étaient diminuées par une injection

intra-cérébroventriculaire (i.c.v.) de leptine alors qu'elle était augmentée avec une injection i.c.v. d'orexine (Julliard et al., 2007). En plus de ces effets sur le seuil de détection olfactive, l'activité d'exploration olfactive d'une odeur alimentaire chez des rats rassasiés augmente suite à une injection d'orexine, mimant ainsi l'état affamé alors qu'une injection d'antagonistes de l'orexine ou de leptine, mimant pharmacologiquement l'état rassasié chez des animaux affamés, diminue l'exploration olfactive de l'odeur alimentaire (Prud'Homme et al., 2009). L'implication des signaux orexigènes ou anorexigènes dans les modifications de l'activité du système olfactif fournit une preuve supplémentaire et solide du rétrocontrôle qu'exerce le statut nutritionnel sur le système olfactif. L'injection intra-cérébro-ventriculaire d'orexine A induit une diminution de l'activité spontanée des M/TC chez le rat anesthésié (Apelbaum et al., 2005), dont les mécanismes ont été décrit par des études sur tranches (Hardy et al., 2005).

Chez l'être humain, les différences de seuil de détection et la valeur hédonique des odeurs alimentaires et non alimentaires restent mal connues et varient en fonction des études (Albrecht et al., 2009), même si certaines données montrent des différences d'influence de la leptine en fonction du sexe sur les seuils de détection et l'identification des odeurs (Karlsson et al., 2002). Plusieurs facteurs entrent en jeu chez l'humain, notamment des éléments subjectifs, rendant difficiles la compréhension de la perception, de l'identification des odeurs mais aussi de l'attribution des valeurs hédoniques. Une chose reste sûre : la perception des odeurs et la valeur que nous leur attribuons reste dépendante de l'état de faim ou de satiété (revue de Yeomans, 2006) (figure 1.12).

2.2. Etudes moléculaires, cellulaires et fonctionnelles par électrophysiologie et imagerie

Ces résultats sur les changements comportementaux traduisent des changements dans les structures périphériques et centrales qui gèrent le traitement sensoriel et le comportement lié au système olfactif. La première structure qui peut être modulée par le statut nutritionnel est le détecteur des odorants, la MO. Elle possède des récepteurs aux peptides signaux du statut nutritionnel, notamment des récepteurs à la leptine et à l'insuline exprimés dans les cils olfactifs des OSN. L'expression des récepteurs à la leptine (Baly et al., 2007) et à l'insuline (Lacroix et al., 2008) augmente après 48 h de jeûne. Des études ex-vivo ont montré une influence de ces deux peptides clés sur l'activité des OSN et sur l'activité électrique de la MO. En effet, des études sur les rythmes de décharge des OSN en patch clamp sur des tranches de MO ont montré que la leptine et l'insuline augmentent les rythmes de décharges spontanées des OSN et inversement diminuent leur capacité à répondre aux odeurs (Savigner et al., 2009). La réponse globale de la MO à un odorant mesurée par électro-olfactogramme est diminuée après instillation d'insuline (Lacroix et al., 2008). Est-ce que le

reste du système olfactif (notamment le BO) présente également un changement d'activité en fonction du statut nutritionnel ou est-il le reflet de l'entrée sensorielle de la MO modifiée par le statut nutritionnel ?

Des marquages immunohistochimiques montrent la présence de récepteurs à la leptine et aux orexines dans le BO (Caillol et al., 2003; Hardy et al., 2005; Prud'Homme et al., 2009). L'étude des gènes d'activité précoce comme le *c-fos* révèle une forte activation des couches mitrales et granulaires du BO chez des animaux à jeun 48h comparés aux nourris en présence d'odeur alimentaire ou familière (Prud'Homme et al., 2009) : de manière très intéressante, cet effet peut être reversé par l'injection locale de leptine ou d'antagonistes des orexines (toutefois, l'injection de leptine en conditions spontanée chez des animaux à jeun 48 h induit une augmentation de l'activité des couches mitrales et granulaires (Prud'Homme et al., 2009, figure 6 C). Des études *in vitro* ont montré que l'activité des MT/C du BO est modifiée par l'application d'orexine dans le bain de perfusion (Hardy et al., 2005). Ces études suggèrent que l'intervention du BO dans la régulation des performances olfactives ne se limite pas à relayer un signal modifié au niveau de l'entrée sensorielle de la MO mais que le traitement bulbaire peut être également affecté par le statut nutritionnel, au travers de la modulation par des signaux hormonaux circulants ou par des neuromodulateurs.

Des études *in vivo* ont été aussi menées depuis près de quarante ans maintenant. Jeanne Pager (1972) a commencé l'étude du BO en étudiant dans des conditions physiologiques de jeûne ou de satiété l'activité des M/TC en fonction du statut nutritionnel (Pager et al., 1972). Ainsi, elle a montré que chez des animaux éveillés les cellules mitrales répondaient plus fortement à une odeur d'aliment après un jeûne de 22 heures que dans un état de satiété. Si cette odeur n'est pas alimentaire, ces différences entre les réponses d'animaux à jeun ou nourris sont abolies. Elle montre également que sans les retours centrifuges (inhibés par section des fibres centrifuges), cette différence de sensibilité aux odeurs alimentaires versus non alimentaires est abolie. Ces résultats sur des enregistrements unitaires ont été repris par Apelbaum et Chaput (2003) également à Lyon. Ils montrent que les cellules mitrales répondent plus fortement chez un animal affamé ce qui montre de façon convergente avec Pager que le BO d'un animal affamé est plus réactif que celui d'un animal rassasié. Cependant, différemment des résultats de Pager, les réponses des mitrales enregistrées chez le rat à jeun sont augmentées quelle que soit la nature de l'odeur. Cette différence est probablement due à la nature du protocole expérimental utilisé : Apelbaum et Chaput (2003) ont travaillé sur des rats anesthésiés tandis que Pager avait travaillé sur des rats éveillés. Ces auteurs émettent l'hypothèse que l'anesthésie change l'état des retours centrifuges en les inhibant, ce qui comme la section des fibres centrifuges, montre que le rétrocontrôle cortical serait responsable de la sélectivité aux odeurs d'aliments. Il faut noter que sur les retours centrifuges sont exprimés des récepteurs CB1 aux endocannabinoïdes qui sont impliqués dans la régulation de l'hyperphagie induite par mise à jeun chez la souris (Soria-Gomez et

al., 2014). Dans la partie des résultats et de la discussion je reviendrai sur l'importance de la régulation des couches d'entrée et de sortie par la leptine.

Ces études montrent une différence dans la représentation temporelle des odeurs, induite par le statut nutritionnel à l'échelle de l'activité unitaire. Une étude ancienne montre une modulation de l'activité du cortex piriforme du chat en fonction du statut nutritionnel (Freeman, 1960). Concernant le BO, Chabaud et ses collaborateurs (2000) ont montré chez des animaux vigiles qu'au moins deux structures présentent une augmentation de la réponse oscillatoire, spécifiquement de l'activité de type bêta, à une stimulation odorante en fonction du statut nutritionnel. De manière intéressante, chez les rats à jeun les réponses oscillatoires aux odeurs dans le cortex entorhinal changent quelle que soit la nature des odorants alors que dans le BO, elles sont sélectivement augmentées pour une odeur alimentaire. En effet, aucune différence n'est observée dans le BO lorsqu'une odeur non alimentaire neutre est présentée. De plus, ces travaux montrent un effet d'habituation chez les animaux nourris lorsqu'ils sont stimulés plusieurs fois avec la même odeur. Cette habituation n'a pas lieu chez les animaux à jeun : lorsqu'ils sont stimulés avec l'odeur alimentaire, ils ne diminuent pas leur réponse. Ces résultats vont dans le sens des travaux de Pager (1972) et montrent une sélectivité des réponses bulbaires aux odeurs alimentaires. Récemment, Thiebaud et al. (2014) ont rapporté une perte nette d'OSN et de leur projections axonales chez des animaux ayant suivi un régime HFD, concomitante avec la diminution de l'amplitude des électro-olfactogrammes enregistrés. Cette perte d'OSNs est associée à des changements de prolifération neuronale et du cycle apoptotique. Lors de tâches comportementales de discrimination olfactive, les souris maintenues sous régime HFD discriminent moins bien les odeurs et apprennent plus lentement une tâche de discrimination olfactive, et lorsque un phénotype normal est restauré après arrêt de la diète HFD, elles conservent leur déficits olfactifs. Un déséquilibre chronique de la balance énergétique semble donc induire des changements structuraux et fonctionnels à long terme dans un système sensoriel conçu pour encoder des informations chimiques et altère les comportements olfactifs et les mécanismes de récompense.

Les résultats obtenus au CRNL montre que l'insuline module l'activité spontanée et l'activité induite par la présentation d'odeur des OSN étudiées sur tranches de MO (Savigner et al., 2009) mais aussi des M/TC enregistrées sur tranches de BO (Kuczewski et al., 2014). Cette hormone a un effet inhibiteur puissant sur les circuits olfactifs. Ces résultats viennent compléter toutes les données de l'équipe de Debrah Fadool en Floride qui a montré dans plusieurs articles la régulation importante de l'activité des cellules mitrales par l'insuline, notamment via l'activation d'un canal potassique (Kv1.3). Une autre étude récente du CRNL a montré que le transporteur de glucose GLUT4 et le co-transporteur sodium-glucose de type 1 (SGLT1) étaient fortement exprimés dans le BO, et que l'expression de GLUT4 y était dépendante de l'état nutritionnel. La concentration de glucose intrabulbaire est également plus élevée que dans le reste du cortex, et contrairement à ce dernier,

semble être sensible aux variations de glycémie (Al Koborssy et al., 2014). Enfin, le CCK sécrété par les cellules TC et exciter les cellules MC, créant ainsi une boucle amplifiant les projections des paires de glomérules activés par la stimulation d'un OR (Ma et al., 2013).

Ces données suggèrent fortement qu'il existe un lien étroit entre la régulation de la balance énergétique et l'olfaction. De fait, le système olfactif n'est plus considéré uniquement comme un détecteur de signaux chimiques externes à l'organisme, mais également comme un détecteur parallèle de signaux chimiques internes liés au métabolisme énergétique (Palouzier-paulignan et al., 2012b).

3. Nouveaux candidats pour la modulation de l'activité olfactive : GLP-1 et PK2

Deux peptides anorexigènes ont été tout récemment étudiés dans le cadre de la régulation de l'activité olfactive dans le BO et ont fait l'objet de présentations très intéressantes respectivement au congrès de la Société Française à Montpellier en 2015 et au congrès de la société américaine de neurosciences à Washington en 2014. Nicolas Thiebaud, de l'équipe de D. Fadool, a montré un rôle important de Glucagon-Like Peptide 1 (GLP-1, une incréline, hormone intestinale, sécrétée en réponse à un repas et inhibant la sécrétion de glucagon et la vidange gastrique) dans la régulation de leur activité par le GLP-1. Une présentation orale de Marie Mortreux à la SFN (Mortreux et al, 2014), en thèse sous la direction de Stephanie Migrenne dans le laboratoire de Christophe Magnan qui collabore avec notre équipe, a décrit les effets de la Prokinéticine 2 (PK2) dans le BO. La PK2 est un neuropeptide anorexigène de l'hypothalamus, dont le rôle avait été montré auparavant dans la neurogenèse olfactive (Ng et al., 2005). La PK2 bulbaire est aussi impliquée dans la prise alimentaire chez des modèles DIO d'obésité.

L'ensemble de ces études montre clairement qu'il existe un rétrocontrôle du statut nutritionnel sur l'activité du BO et que ces mécanismes sont loin d'être complètement élucidés. De plus, il apparaît clairement que les interactions olfacto-alimentaires via les molécules de la régulation de la prise alimentaire et de la balance énergétique est un domaine en expansion et qui verra de nouvelles données publiées dans les prochains mois.

4. Problématique de la thèse : étude de la plasticité spatiotemporelle des représentations sensorielles dans le BO chez les souris ob/ob déficientes en leptine

Je voudrais faire un point rapide sur cette longue introduction avant de poser les questions qui ont animé ma thèse. Nous avons vu que le BO est la première structure qui encode les odeurs. La représentation des odeurs y est spatiotemporelle. Nous pouvons y enregistrer in vivo la répartition spatiale de l'activité par imagerie et la dynamique temporelle par électrophysiologie pendant le comportement. L'activité du BO est fortement régulée par l'état de la balance énergétique. Il a été montré que l'état nutritionnel et les troubles du métabolisme, et notamment l'obésité, perturbent l'expression de protéines régulant la balance énergétique dans des structures du système olfactif. Ces molécules modifient les capacités olfactives des animaux en fonction de leur état nutritionnel et la représentation des odeurs alimentaires. Cependant, leur impact sur la représentation spatiotemporelle des odeurs alimentaires et des odeurs neutres dans le BO, ainsi que la plasticité de cette représentation des odeurs, suite à un apprentissage par exemple, restent à définir dans les modèles animaux de l'obésité. Particulièrement, l'action de la leptine a été relativement peu décrite, alors qu'il s'agit d'une hormone primordiale dans la régulation du métabolisme énergétique et de la prise alimentaire et qui est associée aux troubles de l'obésité. Pour étudier le lien entre obésité, leptine et activité olfactive, il existe des modèles déficients en leptine comme les souris ob/ob. Par ailleurs, dans la littérature se trouvent deux modèles de rongeurs de l'obésité, l'une d'origine génétique (ob/ob chez la souris, fa/fa chez le rat), l'autre d'origine alimentaire. Dans le contexte de cette thèse, il est donc intéressant de confronter la manière dont l'olfaction est impactée dans ces deux modèles différents, l'un centré sur l'implication de la leptine, l'autre reproduisant un métabolisme énergétique globalement perturbé, dont les causes sont plurifactorielles, et généralement plus proche de ce qui est observé chez l'Homme.

Nous avons vu précédemment dans ce chapitre les données intéressantes sur les interactions olfacto-alimentaires et des résultats sur l'obésité que nous pouvons maintenant représenter sous forme d'un triangle (figure 1.13.) dans lequel nous pouvons placer les références majeures de la littérature que nous avons citées jusqu'ici, ainsi que les modèles de souris obèses du chapitre II. Ce triangle se compose de cinq axes majeurs liant olfaction, prise alimentaire et obésité.

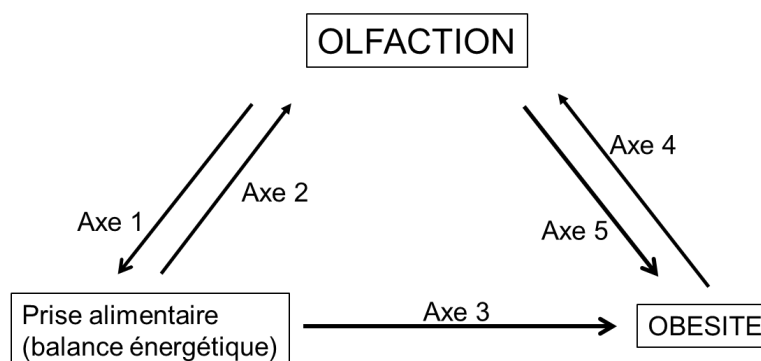


Figure 1.13 Représentation schématique des interactions entre système olfactif, système de régulation de la prise alimentaire et obésité. Les cinq axes sont décrits dans le texte suivant ce schéma.

L'axe 1 est caractérisé par l'influence de l'olfaction sur la prise alimentaire et repose historiquement sur les données de Le Magnen (2001) et plus récemment sur les données de Soria-Gomez et al. (2014)(Le Magnen, 2001; Soria-Gomez et al., 2014)(Le Magnen, 2001; Soria-Gomez et al., 2014)(Le Magnen, 2001; Soria-Gomez et al., 2014)(Le Magnen, 2001; Soria-Gomez et al., 2014). En retour, l'axe 2 décrit l'influence des mécanismes métaboliques sur l'activité olfactive et repose historiquement sur les données de Pager et al. (1972) qui montrent la modification par l'état nutritionnel de l'activité électrophysiologique enregistrée dans le BO chez des rats éveillés. L'axe 3 concerne les modèles de l'obésité chez les rongeurs, notamment souris ob/ob et DIO, et les données chez le rongeur et chez l'Homme qui indiquent que l'augmentation de la prise alimentaire est fortement impliquée dans l'obésité. Dans cet axe apparaissent également des paramètres d'activité, notamment de motricité (Matheny et al., 2009; Pollock et al., 2015). L'axe 4 correspond au contexte de mon sujet de thèse dans lequel nous étudions la manière dont la plasticité olfactive est impactée dans le BO de modèle ob/ob et DIO. Dans cet axe, l'équipe de Deborah Fadool a étudié la plasticité olfactive de la MO dans un modèle DIO, avec une obésité induite de façon plus tardive par rapport à notre protocole (Thiebaud et al., 2014). La littérature abondante de l'INRA de Jouy en Josas et du CRNL sont dans les axes 1,2 et 4. L'axe 5 reste inexploré puisque, malgré le fait qu'il existe une corrélation entre trouble olfactifs et obésité chez l'Homme, aucune étude n'a mis en évidence une relation de cause à effet entre olfaction et obésité : à ma connaissance, il n'existe pas d'étude montrant une induction de l'obésité uniquement via des mécanismes sensoriels. Enfin, il est à remarquer qu'il existe peu de données concernant la régulation de l'activité des circuits bulbaire par la leptine, excepté l'étude en c-fos de Prud'homme et al. (2009).

Pour étudier le lien entre leptine, obésité et activité bulbaire nous avons opté pour l'analyse des souris ob/ob. Pour répondre à la question de la plasticité de la distribution spatiale de l'activité

dans le BO, nous avons développé une étude en MEMRI chez la souris. Le défi était d'observer ces changements d'activité dans tout le BO, en activité spontanée, en réponse à une odeur alimentaire (odeur d'amande rendue appétitive par association à une pâte sucrée), et en réponse à une odeur neutre jamais rencontrée par les souris (pentylacétate). Une injection de leptine était aussi à effectuer chez les ob/ob pour voir si les changements observés étaient réversibles. Etant donné les variations de neurogenèse et d'inflammation qui sont observées dans le cerveau des souris obèses DIO (Boitard et al., 2012, 2014), nous devions également nous intéresser à ces deux paramètres. Le devenir des activités oscillatoires gamma et bêta, bien caractérisés dans le BO, étant totalement inconnues dans les modèles d'obésité, nous avons également entrepris l'étude de cette dynamique temporelle de l'activité du BO chez la souris vigile effectuant une tâche de discrimination olfactive, opérant et renforcée, de type Go/No Go.

A cet axe majeur d'étude des ob/ob, nous avons ajouté en fin de thèse le début d'une étude complémentaire par imagerie MEMRI des souris DIO, dont je présenterai les résultats à la soutenance orale. Sur les DIO nous avons également collectées des données métaboliques et comportementales spontanées pour commencer à y caractériser les interactions olfacto-alimentaires.

Après avoir présenté les développements techniques que nous avons effectués au cours de cette thèse pour répondre aux questions que je viens de poser (partie « méthodes expérimentales»), j'aborderai nos données sur les cartes spatiales, l'activité oscillatoire pendant une tâche de comportement de discrimination odorantes, et la neurogenèse qui sont profondément modifiés chez les souris ob/ob (partie « résultats »). Nous montrons une sensibilité particulière des couches profondes du BO à la présence de leptine et il semble que cette hormone puisse régler ou accorder l'activité d'entrée et de sortie du BO. Enfin, j'aborderai les données de la littérature à même d'appuyer cette interprétation (partie « discussion ») en portant un regard critique sur les limites de nos approches ainsi que celle des données de la littérature pour proposer des perspectives de recherche qui pourraient faire suite à mes travaux.

Partie 2 : Méthodes expérimentales

Le projet éthique correspondant à l'ensemble des expériences menées dans ma thèse, excepté l'expérience en imagerie MEMRI qui fait l'objet d'un projet déposé, a été expertisé et validé par le comité d'éthique en expérimentation animale n°59 (Paris Sud et Centre) et a été enregistré sous le numéro 01847.01 par le ministère de la Recherche. J'ai moi-même passé mon habilitation à expérimenter sur animaux vivants en septembre 2014. J'ai un passeport de compétences à jour. Toutes les expériences sur les souris ont été conduites en accord avec la Directive Européenne 2010/63/UE relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques.

Les cinq groupes d'expériences « comportement olfactif spontané, imagerie, comportement opérant associé à l'électrophysiologie, quantification de la neurogenèse, quantification par RTPCR de l'inflammation » ont été effectués sur des groupes de souris obèses et de souris témoins qui sont propres à chaque groupe d'expérience, les souris n'ayant pas été utilisées d'une série d'expériences à l'autre.

1. Animaux, hébergement et alimentation

Les animaux utilisés au cours de cette thèse provenaient tous des laboratoires Janvier (Le Genest-St-Isle, France). Tous les animaux ont été placés dans l'animalerie de l'Institut de Biologie Animale Intégrative et Cellulaire (IBAIC), qui incorpore le bâtiment d'IMNC. Le numéro d'agrément C91471104 fourni par les services vétérinaires de la Direction Départementale de la Protection des Populations pour l'animalerie court jusqu'en 2018. La température de l'animalerie ($22 \pm 0.5^\circ\text{C}$), l'humidité ($50 \pm 5\%$) et les cycles de lumière/obscurité alternés (12h/12h, 8h-20h) ont été maintenus de façon constante pendant le séjour de l'ensemble des animaux utilisés.

Après l'accueil en animalerie des souris en provenance de la société Janvier Lab, tous les animaux ont eu un temps d'acclimatation d'au moins une semaine avant de débiter les expériences d'imagerie en aigu ou les implantations chroniques d'électrodes pour les enregistrements pendant le comportement. Ce délai d'une semaine a été respecté également pour le début des expériences de neurogenèse ou pour les quantifications par RTPCR.

Les témoins homozygotes (+/+, C57BL6, âgés de 6 à 10 semaines) et hétérozygotes (ob/+, de même âge) ont eu un accès ad libitum à l'eau et à la nourriture (Maintenance diet for Mice A04, SAFE Diets, Augy, France) riche en protéines (16.1%) et en amidon (43.5%), mais relativement pauvre en lipides (3.1%) et en sucres (3.2%), pour un apport calorique total de 2791 kcal/kg (figure 2.1). Nous avons choisi de travailler avec des souris mâles C57BL/6j puisque c'est le fond génétique des souris obèses ob/ob, et qu'il s'agit d'une souche particulièrement utilisée pour les modèles d'obésité DIO.

Les souris homozygotes ob/ob, génétiquement déficientes en leptine (« ob » indique qu'un des deux allèles du gène pour la leptine est inactif) et de même âge que les témoins ont quant à elles eu un accès ad libitum à l'eau, mais pas à la nourriture, limitée à 3g par jour/souris. Nous avons été contraints de minimiser la prise de poids de ces souris obèses hyperphagiques afin de ne pas entraver les performances des animaux pendant les expériences comportementales et de ne pas gêner la mise en place et le maintien des animaux au cours de certains protocoles, comme par exemple dans l'aimant de l'IRM.

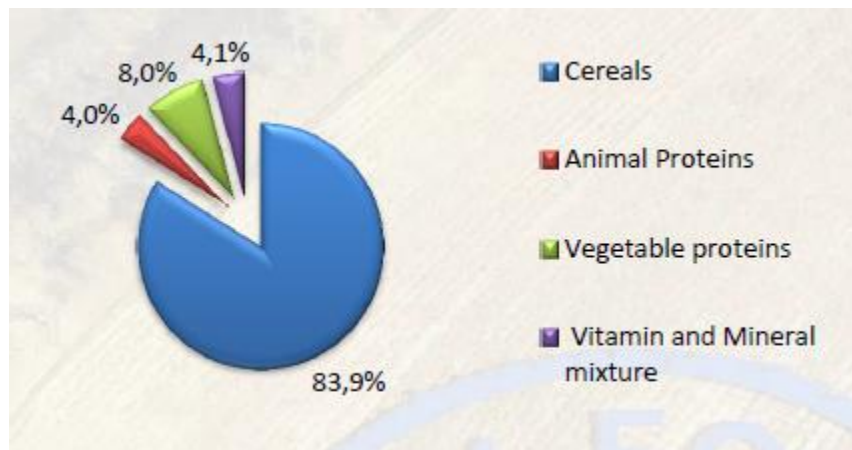


Figure 2.1 Composition de la nourriture standard (site internet du fabricant Safe).

Les animaux DIO sont des souris C57BL/6J mâles de 5 semaines ayant eu un accès ad libitum à l'eau et à un régime très riche pendant au minimum 3 mois, avec un suivi de poids hebdomadaire. Pour le premier lot de souris, nous avons utilisé le régime Purified Diet 235 HF de SAFE diets, présenté sous forme de granules de 10 mm, riche en protéines (17%), lipides (22.5%) et en sucres (42.3%), pour un apport calorique total de 4397 kcal/kg (soit une augmentation de l'apport énergétique de 57% par rapport au régime standard). La ration alimentaire se composait à la fois de nourriture hypercalorique et de nourriture standard de sorte que la souris avait le choix dans sa consommation alimentaire. Cela nous a permis de vérifier que les souris consommaient la nourriture grasse par choix et non pas par obligation si elles n'avaient que la nourriture hypercalorique à manger.

Pour les souris DIO, les témoins sont des animaux mâles de même souche (C57BL/6j) de même âge, et issus du même lot. Ces souris témoins placées dans une cage distincte des DIO sont dans des conditions de nutrition ad lib par nourriture standard.

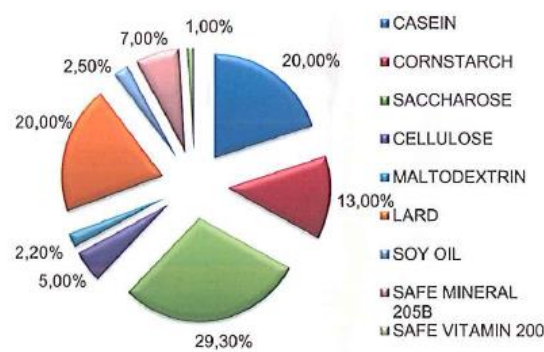


Figure 2.2. Composition détaillée de la nourriture 235HF (site internet du fabricant Safe).

Malheureusement, ce premier régime 235HF ne s'est pas révélé efficace pour produire une prise de poids chez les C57BL6, les animaux DIO ne présentant pas de différence significative de poids avec les témoins. En analysant la consommation journalière de ces granules, il s'est avéré que celle des animaux DIO était beaucoup plus faible que celle des animaux témoins nourris avec la nourriture standard et également inférieure aux recommandations du fabricant (entre 3 et 6g par jour et par souris), nous amenant à nous interroger sur la palatabilité du régime choisi.

Nous avons alors utilisé le régime Purified Diet 230 HF du même fabricant, présenté sous forme de pâte compacte, riche en protéines (17,4%), plus riche en lipides (35,8%) mais moins en sucres (35%) que la nourriture standard, pour un apport calorique total plus important à 5317 kcal/kg (soit une augmentation de l'apport énergétique de 90% par rapport au régime standard). La composition détaillée de la nourriture 230HF est fournie ci-dessous.

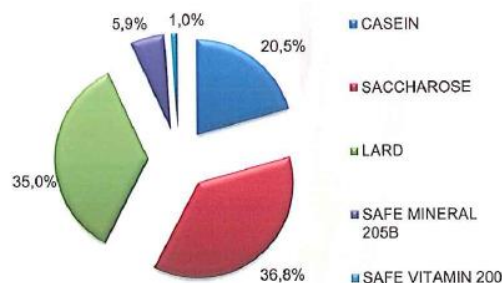


Figure 2.3. Composition détaillée de la nourriture 230HF (site internet du fabricant Safe).

Ce second régime a été mieux assimilé par les animaux, qui ont consommé la quantité préconisée par le fabricant et ont pris plus de poids que les animaux témoins, pour présenter un

phénotype obèse après 3 mois de régime (Poids moyen des animaux obèses \geq Poids moyen du groupe témoins + 3 SEM). Ce régime contient une quantité totale de sucres moins importante, mais la source principale de sucre est le saccharose, alors que le régime standard contient principalement de l'amidon. Par ailleurs, ce régime est constitué de 35.8% de lipides (contre seulement 3.1 % dans un régime standard), ce qui représente un apport lipidique onze fois supérieur en comparaison avec le régime standard.

2. Phénotype général des souris obèses

2.1. Pesées

Le poids des souris DIO a été relevé toutes les semaines pendant 3 mois (qui est la durée standard préconisée pour induire une obésité avec un régime HF), tandis que celui des souris ob/ob a été relevé en fonction des expériences : comme précisé précédemment, pour ne pas gêner la mise en place des animaux ob/ob dans l'aimant de l'IRM, nous devions limiter la prise de poids de ces souris et effectuer rapidement les acquisitions après leur arrivée au laboratoire. La pesée était effectuée à titre de vérification avant l'expérience. En revanche, les animaux suivant le protocole de comportement Go/Nogo étant soumis à une restriction hydrique, nous avons suivi quotidiennement le poids des animaux pour relever une éventuelle anomalie, mais leur poids est resté stable, chez les ob/ob comme chez les témoins. La pesée de la nourriture consommée était effectuée en même temps que la pesée des animaux, et effectuée sur la cage entière, en vérifiant que les animaux n'aient pas dissimulés de nourriture dans leur litière.

Nous avons mesurée la prise alimentaire par cage de souris sur 24 heures puis ramené cette consommation à chaque souris en divisant par le nombre de souris de la cage. Pour connaître réellement la consommation individuelle, il faudrait isoler les souris, ce que nous ne pouvons pas faire puisque l'isolement impacterait leur comportement et leur prise de poids.

2.2 Glycémie

Nous avons dosé la glycémie des souris grâce à l'appareil Glucofix de Menarini (utilisé en clinique humaine et vendue en pharmacie). L'utilisation de cet appareil ne présente que peu de contraintes, et consomme très peu de sang par bandelette de mesure, étant donné que la glycémie chez les mammifères a la même valeur à jeun, d'environ 0.7 à 1.1 g/litre environ. La prise de sang a lieu

sous anesthésie très légère à l'isoflurane en piquant délicatement l'extrémité de la queue de l'animal grâce à une aiguille 26G. La goutte de sang est recueillie sur la bandelette de mesure. La bandelette est placée dans l'appareil (qui est calibré régulièrement grâce à des solutions étalons du fournisseur) et une lecture optique permet de connaître la valeur de la glycémie. L'ensemble de la mesure dure environ 10 secondes. Les mesures sont faites chez les souris nourries et les souris mise à jeun la nuit, pendant 17 heures, de 16 h à 9 heures. Ce temps de 17h est l'équivalent des 24h de mise à jeun chez l'Homme et indique si l'ensemble des mécanismes conduisant à la régulation de la glycémie à jeun sont intacts.

2.3. Locomotion

L'observation globale des souris obèses ob/ob montre qu'elles sont moins actives dans leur cage d'accueil à l'animalerie que leurs témoins et voisines dans l'armoire ventilée. Pour mesurer l'activité locomotrice générale des souris et savoir si les obèses respectent les cycles circadiens d'activité, nous avons testé, avec l'aide d'Alexis Faure, leur locomotion dans un actimètre automatique, composé de 8 cages individuelles transparentes (20 cm de haut pour 10 cm de large et de profondeur) (équipe de Sylvie Granon au laboratoire NeuroPSI d'Orsay). Chaque cage contient une série de faisceaux de lumière infrarouge et virtuellement divisée en quatre parties, la mesure du nombre d'interruption des faisceaux étant effectuée sur 24h en disposant boisson et nourriture dans la cage test. Chaque souris dans sa cage test a une période d'habituation de 2 jours avant la mesure de son activité. Le nombre de coupure des faisceaux (un point moyenné toutes les 30 min) correspond aux déplacements faits par l'animal et constitue une mesure globale de l'activité de chaque souris au cours d'un cycle de 24h.

2.4. Analyse statistique

L'analyse statistique des résultats sur la phénotypage des souris est réalisée avec le logiciel Statview. Les données obtenues étant nombreuses et suivant une distribution normale, nous avons choisi le t test de Student apparié (intragroupe) et non apparié (intergroupe) comme test statistique pour comparer les souris obèses versus les souris témoins pour la masse corporelle et la glycémie. Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm erreur type de la moyenne (Standard Error of the Mean, S.E.M). Le seuil de rejet de l'hypothèse nulle pour l'ensemble des analyses est de 5 %.

Dans toutes les figures du manuscrit, les degrés de significativité seront indiqués par * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

3. Odeur alimentaire et odeur neutre utilisées pour le MEMRI

3.1. Fabrication de l'odeur alimentaire et choix de l'odeur neutre

Pour les expériences d'imagerie MEMRI, le choix des odeurs utilisées ne pouvait être basé uniquement sur des critères chimiques. En premier lieu, les animaux devaient apprendre à associer l'une des odeurs présentée à un aliment pour pouvoir ensuite comparer celle-ci à une odeur à valence neutre (qui n'a jamais été rencontrée au préalable par les animaux). Ensuite, cette odeur devait induire un signal fonctionnel enregistrable dans le BO. Ce n'était malheureusement pas le cas du régime A04 délivré habituellement aux souris, comme a pu le constater notre équipe et avant nous celle de Nadine Ravel à Lyon (Chabaud et al., 2000). Lors de la thèse de Mounir Bendahmane au laboratoire sur la plasticité olfactive chez des rongeurs à jeun, il avait été montré une association efficace et durable entre une odeur d'arôme d'amande (Vahiné, solution commerciale pour la cuisine) et une pâte à base de farine et très légèrement sucrée. Nous avons pu répliquer la création de cette odeur alimentaire avec succès chez nos souris en fabriquant la pâte suivante : 100g de farine, 5.3g de sucre, 100 ml d'eau, 1 ml d'arôme d'amande, et chauffée au four à micro-ondes pendant quelques secondes. Les animaux ont reçu une boulette de 0.5g de cette préparation un jour sur deux pendant plusieurs semaines, suite à quoi ils ont développé une nette attirance pour ces nourriture, qu'ils ont consommé avidement même en étant nourris ad libitum avec la nourriture Safe standard.

L'odeur à valence neutre que nous avons utilisée est le pentylacétate. Bien qu'étant aversive à forte concentration, elle fait partie d'une famille de molécules odorantes classiquement utilisée dans les études olfactives chez le rongeur, notamment d'IRM fonctionnelle de type Blood Oxygen Level dependent dans le BO de rat (Yang et al., 1998, Martin et al. 2007) ou précédemment utilisée dans le cadre d'une étude par MEMRI du BO par notre équipe (Gobbo et al., 2012). Cette odeur est connue pour induire une activité globale dans toutes les régions du BO.

3.2. Tests comportementaux d'exploration olfactive spontanées (non opérants)

Tous les tests ont lieu le matin entre 9h et midi. Les souris sont identifiées par un marquage à l'oreille et passent dans un ordre aléatoire, c'est-à-dire que ce ne sont pas les mêmes souris qui ont fait le test à 9h à chaque fois. Ils ont été effectués par Laurène Abjan (stagiaire M1 encadrée par H. Gurden) et Hirac Gurden.

Exploration de la pâte odorisée versus la pâte non odorisée

Comme il avait été démontré que les souris ob/ob étaient plus rapides à détecter une nourriture très palatable cachée sous la sciure (cookie à base de beurre de cacahuète, (Getchell et al., 2006)), nous avons voulu effectuer deux tests complémentaires de ce test de détection en utilisant notre propre cookie odorisé. Nous avons d'abord étudié chez des souris nourries l'effet de l'odeur d'amande par rapport à des indices visuels, ou par rapport à « une odeur de type sucré » qui pourrait être contenue dans la pâte puisqu'elle est composée partiellement de sucre, en comparant le temps d'exploration de la pâte odorisée versus la pâte non odorisée. Chacune des pâtes est placée dans un cône de pipette automatique de 1 ml dont l'embouchure est coupée et élargie. Les deux cônes sont placés sur la grille de la cage test (cage ventilée Allentown L :40 cm , l :25 cm, H :18 cm contenant de la sciure) à 10 cm l'un de l'autre. Les souris sont habituées à la cage test, contenant deux cônes vides à 10 cm d'écart (ce sont ces mêmes cônes qui seront remplis de pâte le jour test), une heure tous les jours pendant quatre jours avant le test qui a lieu le cinquième jour. La pâte est assez enfoncée dans le cône pour que la souris ne puisse pas la goûter avec sa langue. L'emplacement du cône cible entre souris se fait suivant un ordre aléatoire.

Nous avons alors répliqué ces expériences chez des souris à jeun de 17 heures avant le test. Pour ne pas induire d'interférence avec le test à l'état nourri, nous avons espacé les tests d'au moins quinze jours et nous avons systématiquement inversé la position des cônes contenant la pâte odorisée versus non odorisée. Il est à noter que les tests ont toujours été faits dans le sens « 1^{er} essai nourri, 2^{ème} essai à jeun ». Nous aurions voulu obtenir des données chez les souris ob/ob à jeun mais elles deviennent totalement immobiles après une période sans nourriture de 17h. Comme nous l'avons décrit en introduction, une mise à jeun induit un changement drastique de la balance énergétique avec, pour les hormones synthétisées en périphérie, une baisse aiguë et provisoire de leptine et d'insuline et une augmentation de ghréline. Il est donc probable que ces changements affectent le métabolisme et/ou la motivation des souris déficientes en leptine. Cependant, nous avons indiqué les résultats obtenus à jeun chez les témoins ob/ob, les DIO et leurs témoins pour montrer que leur sensibilité olfactive était accrue dans ces conditions.

Pour permettre l'enregistrement des déplacements de l'animal dans la cage et autour des cônes, une caméra est fixée pour prendre une vue de face et une autre en biais sur le côté permet de prendre une vue complémentaire si la vue de face n'est pas bonne comme sur les photos ci-dessous où on voit l'exploration d'un cône par une souris ob/ob.



Figure 2.4. Prise de vue des deux caméras, l'une de face à gauche et l'autre de biais à droite, de l'activité d'exploration spontanée. A) et B) souris ob/ob explorant un cône contenant la pâte odorisée à l'amande (prise de vue de face et de côté). Notez l'utilité des deux vues. C) Souris DIO explorant un cône contenant un papier filtre imbibé de l'odeur alimentaire (50µl de l'arôme d'amande à 5%, vue de côté). D) Souris témoin dans la même situation qu'en C. E) Souris témoin DIO explorant le cône contenant du papier filtre imbibé de l'odeur neutre (50µl de pentyl acétate à 5%, vue de face).

Seuls sont comptés les temps en seconde que chaque souris passe clairement à explorer le cône au contact ou très proche de celui-ci en position de flairage. Le temps d'exploration est fixé à 3 minutes. La mesure du temps d'exploration a été faite en aveugle par deux personnes (Laurène Abjan, stagiaire de M1 au laboratoire et Hircac Gurden) sous le logiciel libre Kinovea qui permet de faire des ralentis de la vidéo.

Exploration de l'odeur d'amande, de l'odeur d'orange et de l'odeur de pentylacétate

Ce test permet de tester l'attractivité de l'odeur alimentaire en mesurant le temps que passe chaque animal à explorer un cône contenant l'odeur alimentaire, puis des cônes contenant des odeurs neutres. Il a été effectué et analysé par les deux personnes précédemment citées. Avec le même protocole et dispositif expérimental, nous avons mesuré le temps d'exploration de l'odeur d'amande diluée à 5% (la concentration utilisée pour la stimulation odorante dans les expériences de MEMRI) dont 50 µl ont été placées sur un papier filtre qui a été glissé dans un cône de pipette de 1 ml. Un autre cône contenant un papier filtre imbibé de 50 µl d'huile minérale a été placé à 10 cm du cône cible.

L'arôme d'orange est fabriquée également par Vahiné et disponible dans le commerce. 50 µl d'une solution à 5% sont disposés tous les jours dans une boule à thé remplie de sciure et déposée dans la cage d'accueil de toutes les souris. L'habituation à l'odeur dure pendant deux semaines avant le jour test qui a lieu comme précédemment décrit. Cette odeur est connue par les souris mais non associée à une nourriture. Enfin, nous avons utilisé le pentyl d'acétate comme odeur neutre, jamais rencontrée par les souris avant le jour test. Comme il a été reporté que l'odeur de pentylacétate à forte concentration pouvait être aversive, nous avons utilisé cette odeur à une concentration non aversive de 5%, équivalente à celle de l'odeur d'amande. Cette molécule odorante simple qui rappelle l'odeur de

banane a été utilisée dans de nombreuses études comportementales (Prud'homme et al., 2009) et d'imagerie (Martin et al., 2007).

3.3. Analyse statistique pour le comportement olfactif spontané

Dans ces tests comportementaux non opérants, nous avons un groupe de souris réduit en nombre et surtout un nombre de passage en test qui est unique pour ne pas habituer l'animal à l'odeur testée. Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm erreur type de la moyenne (Standard Error of the Mean, S.E.M). Dans ce cadre nous avons opté pour un test non paramétrique de Mann-Whitney pour tester des différences entre les groupes, en utilisant le logiciel Statview. Le seuil de rejet de l'hypothèse nulle pour l'ensemble des analyses est de 5 %.

4. Conditions expérimentales de l'imagerie MEMRI

4.1. Injection de manganèse, stimulation olfactive et enregistrement IRM

Le principe général de la technique est d'effectuer le marquage de l'activation par manganèse chez l'animal vigile avant de passer l'animal en IRM. L'IRM de pondération T1 révèle, par enregistrement de l'animal à l'état anesthésié, l'accumulation de manganèse qui a eu lieu dans le BO pendant la période vigile, avant de passer dans l'aimant. De fait, avant de débiter l'acquisition IRM, les animaux reçoivent à 10 min d'intervalle deux injections de 10 μ l de chlorure de manganèse (solution isotonique de 10mM) dans chaque narine via une seringue Hamilton de 10 μ l. Cette injection alternative permet à la souris de respirer sans difficulté. Après 20 minutes, soit le temps minimal nécessaire pour que le manganèse soit chargé dans les neurones olfactifs (Gobbo et al., 2012), les animaux ont été placés dans une boîte perforée de nombreux trous pour l'aération et l'évacuation des pulses d'odeur. Les pulses sont délivrés à la main en poussant doucement une seringue de 60 ml connectée à chaque filtre pour filtration d'échantillon (Sterile syringe filter VWR, pore de 0.2 μ m) pendant 30 secondes. La stimulation a lieu pendant 10 min par des pulses alternatifs de 30 secondes d'air et d'odeur (Amande 5% ou Pentylacétate 1 et 5%, dilution dans l'huile minérale, à pression de vapeur saturante) poussées dans une petite boîte plastique (L : 12 cm ; H : 10 cm ; l : 8 cm). Ce type de stimulation permet d'éviter l'habituation et est inspirée d'une étude précédente de l'équipe en 2DG (Martin et al., 2012) et en MEMRI (Gobbo et al., 2012). Pour estimer l'activité spontanée dans le BO, les souris ont reçu uniquement des pulses d'air.

4.2. Protocole d'acquisition MEMRI

La technique de MEMRI chez la souris a été mise au point sur la plateforme d'IRM du laboratoire d'Imagerie par Résonance Magnétique Médicale et Multi-Modalités d'Imagerie (IR4M, CNRS UMR8081) par l'ingénieure de la plateforme, Catherine Sébrié et Caroline Sezille, une étudiante en M2 qui a précédé mon arrivée à IMNC. J'ai retravaillé ce protocole avec Catherine Sébrié notamment pour déterminer le temps optimum d'estimation du signal MEMRI après l'injection de manganèse. La vitesse de transport antérograde du manganèse étant comprise entre 3.6 et 18 mm/h, on peut considérer que le manganèse atteint les glomérules olfactifs du BO après 90 min (Roy et al., 2005; Gobbo et al., 2012). Avant d'être placés dans l'aimant, les animaux ont été anesthésiés sous isoflurane (induction à 2%, maintien à 1.5% dans un mélange de 30% O₂, 70% air, à un débit de 1L/min). La température corporelle de l'animale était maintenue à 37°C tout au long de l'acquisition grâce à une couverture chauffante (circulation d'eau chaude). Les images ont été acquises toutes les 30 min, entre 90 et 210 min après l'injection de manganèse, dans un aimant horizontal (Oxford, UK) d'un champ magnétique d'intensité 7 T (Tesla), piloté par le logiciel Paravision (Bruker), équipé d'un canon de gradient de 300 mT/m (diamètre interne [ID]= 90 mm, Bruker). La tête des animaux était placée dans une bobine « bird-cage » 1-H (ID=22mm). La tête a été positionnée en utilisant des images de gradient-écho dans les 3 directions orthogonales. Après le processus de recalage, 4 séquences MEMRI ont été acquises [TR/TE = 15/4.5 ms, 2 moyennes, Temps de répétition du Segment/ Durée= 6000/360ms, 8 segments, FOV=20x20x3.2 mm, et taille des voxels = 78x78x80µm³]. Après traitement des images et observation de l'accumulation du manganèse dans le BO, nous avons choisi de traiter les images acquises 150 min après injection, cette durée nous assurant la présence de manganèse dans l'ensemble du BO tout en évitant une accumulation trop importante.

4.3. Analyse manuelle des images MEMRI

Pendant la première moitié de ma thèse, j'ai analysé les images acquises en MEMRI manuellement. Nous avons pour cela utilisé le logiciel ImageJ. Après avoir converti les images au bon format, nous nous sommes assuré que l'intensité maximale de l'image, induite par le manganèse, était localisée au niveau du BO. Dans le cas contraire, nous avons considéré l'expérience comme un échec. Nous avons ensuite défini une région d'intérêt (ROI) de 10 x 10 = 100 pixels d'intensité uniforme sur tout l'axe rostro-caudal dans la joue de chaque animal. Constante d'un animal à l'autre et d'intensité assez faible, cette ROI a été utilisée en tant que zone de référence pour évaluer l'augmentation de l'intensité relative à l'injection du manganèse et l'activité glomérulaire au sein du BO.

La position au sein de l'aimant et les coordonnées des structures cérébrales étant de ce fait différentes d'un animal à l'autre, nous avons dû définir un point anatomique de référence avec peu de

variabilité inter-individuelle. J'ai choisi de me baser sur la partie rostrale du BO principal, sur l'image où apparaît pour la première fois le BO Accessoire (AOB) : aisément identifiable d'un animal à l'autre sur les images, l'AOb est situé à l'arrière et au-dessus du BO principal, et les fibres afférents, provenant notamment de l'organe voméronasal, y sont organisées de façon bien plus groupée et dense que celles du BO principal, constituant ainsi une limite anatomique distincte. La partie la plus caudale du BO n'étant a priori peu ou pas activée par les odeurs que j'ai utilisées, et l'analyse manuelle étant très lourde, j'ai uniquement analysé un axe de 7 coupes de 400µm en amont de l'AOb pour l'analyse brute manuelle. La technique décrite en 4.4 a permis par la suite d'analyser l'ensemble du BO de façon automatisée.

Pour déterminer les pixels correspondant à une forte absorption du manganèse et donc à une forte activité physiologique en réponse aux stimulations, j'ai évalué la distribution des pixels dont l'intensité était comprise entre la valeur d'intensité maximale de l'image (intmax) et 95% de cette intensité maximale ($0.95 \text{ intmax} < \text{intpixels activés} < \text{intmax}$). Cette valeur est prise comme seuillage usuel dans beaucoup d'études où la distribution des pixels de l'image n'est pas gaussienne (thèse de doctorat de Chrystelle Po à l'IR4M (<http://www.theses.fr/2009EVRY0002>)): dans mon cas elle a permis de n'isoler que les pixels en surbrillance en ajustant le contraste de l'image avec les valeurs adaptées. La somme de l'intensité des pixels activés et leur position ont été relevées et comparées entre chaque groupe. Dans la partie 'Résultats' je montre en quoi cette étude manuelle était limitée et pourquoi nous avons préféré mettre au point une méthode statistique d'analyse d'image indépendante de l'utilisateur.

4.4. Analyse des signaux MEMRI par Statistical Parametric Mapping (SPM)

Après un jury de mi-thèse animé et positif où j'ai pu interagir pleinement avec Emmanuel Brouillet et Benoist Schaal, M. Brouillet nous a conseillé de chercher avec l'aide d'Albertine Dubois, IR spécialisée dans le traitement du signal à IMNC, une autre méthode plus objective pour analyser le signal MEMRI. Une réunion avec la cellule informatique d'IMNC a été organisée et Albertine Dubois nous a proposé d'utiliser une méthode d'analyse voxel à voxel par comparaison statistique de groupes, méthode qu'elle avait préalablement utilisée pour l'analyse de signaux radioisotopiques (Dubois et al., 2010).

Cette méthode d'analyse voxel à voxel est entièrement automatique et permet l'identification de zones de modifications fonctionnelles significatives entre deux groupes d'images de manière exploratoire et sans a priori (analyse simultanée de l'ensemble des voxels de l'image). Cependant, étant donné que la morphologie du cerveau de chaque animal peut être différente, l'utilisation de cette

méthode d'analyse nécessite d'appliquer aux images à analyser un certain nombre d'étapes de pré-traitement, suivi d'une normalisation spatiale et d'un lissage.

Les images volumétriques en 3D acquises par MEMRI ont été pré-traitées à l'aide du logiciel Anatomist/BrainVisa (<http://brainvisa.info>) selon les étapes suivantes : 1) Un recalage rigide en 3D a été appliqué entre chaque image MEMRI de cerveau de souris et l'image MEMRI du cerveau d'une souris choisie comme référence (d'après le placement de l'animal dans l'IRM ainsi que le positionnement de la bobine). Les 6 paramètres décrivant la transformation rigide à appliquer entre chaque image et l'image choisie comme référence ont été calculés par maximisation de l'information mutuelle, critère de similarité classiquement utilisé en recalage d'images (Wells et al., 1996; Maes et al., 1997) ; 2) Chaque image MEMRI a ensuite été rééchantillonnée à partir des paramètres de transformation préalablement obtenus. Ces deux étapes de pré-traitement nous ont permis d'ajuster spatialement chaque image MEMRI de sorte que le cerveau de chaque souris soit toujours dans la même position, facilitant par là même l'étape de normalisation spatiale suivante.

Le repère d'espace standard commun nécessaire à la normalisation spatiale de toutes les images MEMRI a été défini en créant un « template » (patron ou modèle) du BO de souris, spécifique à notre étude. Pour cela, nous avons tout d'abord sélectionné un cerveau de référence parmi les animaux non stimulés avec une odeur, que nous avons lissé à l'aide d'un filtre gaussien (FWHM = 3 fois les dimensions des voxels). Une transformation affine suivie d'une normalisation non linéaire a ensuite été appliquée à chaque image MEMRI, déformant ainsi le cerveau de chaque souris de sorte à ce qu'il ressemble le plus possible au cerveau de référence lissé (Friston et al., 1995; Ashburner and Friston, 2000). L'image du cerveau de référence et les images normalisées des autres cerveaux ont ensuite été regroupées afin de créer une image moyenne. Cette image moyenne a été lissée par le même filtre gaussien que précédemment, créant ainsi le « template » final du BO de souris. Chaque image MEMRI obtenue après pré-traitement a été normalisée spatialement sur le « template final » lissé puis, individuellement lissée. La création du « template » spécifique et la normalisation spatiale ont été réalisées à l'aide du logiciel SPM8 (Wellcome Department of Imaging Neuroscience, London, UK; <http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/>) muni de la boîte à outils SPMMouse toolbox (<http://spmmouse.org>).

L'accumulation de manganèse durant une stimulation olfactive entraîne une augmentation du signal sur les images pondérées T1 dans les régions actives du BO. Pour valider notre approche MEMRI/SPM de l'enregistrement de l'activité olfactive, nous avons réalisé toute une série de comparaison : en premier lieu, nous avons comparé l'activité spontanée à l'activité en réponse à une odeur alimentaire dans les groupes témoins et ob/ob (comparaison intragroupe). Nous avons ensuite effectué des comparaisons inter-groupes pour les mêmes conditions, et dans le cadre de la présentation

d'une odeur neutre. Enfin, nous avons étudié l'impact de la leptine sur l'activité spontanée et induite par une odeur alimentaire chez les animaux ob/ob. Toutes ces comparaisons ont été réalisées à l'aide du logiciel SPM8. Pour chaque comparaison, deux "contrastes" ont été simultanément définis puis estimés, rendant possible la création de deux cartes statistiques paramétriques : une carte indiquant les voxels présentant une activité significativement plus forte dans l'un des groupes par rapport à l'autre (indiquant une plus forte accumulation de manganèse), et une carte indiquant les voxels présentant une activité significativement plus faible dans l'un des groupes par rapport à l'autre (indiquant une plus faible accumulation de manganèse). Nous avons limité chaque analyse statistique à l'ensemble des régions du BO, soit l'équivalent de 40 tranches. Ces régions ont été délimitées manuellement sur l'image de référence, qui avait été au préalable normalisée spatialement. Pour caractériser les voxels dont les valeurs, entre deux groupes d'images, sont significativement différentes, on doit appliquer sur chaque image paramétrique correspondante un seuil de significativité. Suivant la convention statistique usuelle, la valeur de ce seuil de significativité a été fixée dans cette étude à $P < 0.05$ (non corrigée pour les comparaisons multiples). Nous n'avons pas fixé de seuil sur le nombre minimum de voxels contigus pour qu'un agrégat ("cluster" en anglais) soit considéré comme significatif. Les voxels contenus dans les images paramétriques dont les valeurs (correspondant aux valeurs des tests statistiques réalisés pour chaque voxel) sont supérieures au seuil de significativité ont alors été représentés suivant une échelle de couleurs en 2D. Les images ainsi obtenues fournissent une représentation quantitative des motifs d'activité odeur-dépendante et visualisables grâce au MEMRI au sein du BO. Enfin, les différences d'intensité moyenne ont également été calculées pour chaque groupe de voxels contigus (agrégat) considéré comme significatif lors de l'analyse par SPM. Les intensités étaient exprimées en valeur brute et en unité arbitraire (u.a.) comme expliquées dans la partie résultats.

4.5. Marquage anatomofonctionnel complémentaire du signal MEMRI

Nous avons comparé le signal MEMRI à des coupes du BO marquées suivant trois techniques, deux anatomiques (coloration par cresyl violet du cytoplasme et marquage DAPI, une molécule fluorescente qui s'insère dans l'ADN) et l'autre fonctionnel (2DG) qui ont été obtenus par stimulation avec le benzaldéhyde (molécule à la base de l'odeur d'amande) dans le BO. Cette molécule simple avait été étudiée précédemment par l'équipe en utilisant une technique d'imagerie autoradiographique révélant l'accumulation de $[^{14}\text{C}]\text{-2DeoxyGlucose}$ dans les neurones activés que je ne détaillerai pas ici mais qui est pleinement décrite dans (Martin et al., 2012).

5. Injection de leptine

Pour estimer l'effet d'une injection i.p. de leptine sur le signal enregistré chez les obèses et les témoins, que ce soit en activité spontanée ou en stimulation avec l'odeur alimentaire, 3 injections de leptine (1mg/kg, R&D systems, Lille) ont été effectuées: une injection par jour pendant 2 jours avant le jour d'acquisition MEMRI et la dernière injection qui a lieu le jour de l'IRM 20 minutes avant la stimulation olfactive et dix minutes après l'injection du manganèse. Toutes les injections ont été faites à la même heure pour chaque animal. Les acquisitions ont débuté 90 min après la première injection de chlorure de manganèse, ce qui correspond à la durée requise pour que le manganèse parvienne jusqu'aux glomérules et permette l'enregistrement d'images exploitables (Gobbo et al., 2012). Dans le cas de l'injection de leptine le temps séparant l'injection de manganèse de l'enregistrement en IRM était plus élevé de 10 min.

6. Conditions expérimentales de l'Imagerie Optique du Signal Intrinsèque

Avant d'aboutir aux enregistrements par MEMRI, j'ai essayé d'enregistrer les cartes spatiales sur la surface dorsale du BO par une technique d'imagerie optique disponible en routine au laboratoire et qui a la résolution spatiale suffisante pour dénombrer des glomérules individuels (Chery et al., 2011). Malheureusement je n'ai pu enregistrer que deux souris, ayant perdu à l'anesthésie (kétamine+médétomidine) plusieurs souris obèses qui ne supportaient pas ce régime anesthésique. Je décris ces problèmes en détails dans l'exposé des résultats.

6.1. Anesthésie des souris témoins et ob/ob

Les anesthésiques affectant les signaux fonctionnels d'origine vasculaire obtenus en IOSI, le mélange pharmacologique choisi devait être adapté en nous permettant de minimiser l'atténuation des signaux. Nous avons choisi d'injecter aux souris de la kétamine (antagoniste des récepteurs NMDA glutamatergiques) associée à de la médétomidine (antagonistes des récepteurs alpha-2-adrénergiques). Le protocole d'anesthésie utilisé pour cette expérience a été validé auparavant dans le laboratoire par le travail de doctorants précédents, Barbara L'Heureux et Romain Chery. Il s'agit du mélange suivant : Injection intraperitonéale (i.p) d'un volume de 0.1 mL / 10g d'une solution de kétamine (75mg/kg) et de médétomidine (0,425 mg/kg). La solution mère a été préparée à partir de 1.5mL de kétamine

(Imalgène 500 ®, Merial, France) et de 0.54mL de médétomidine (Domitor®, Pfizer, France) ajustée à un volume total de 10 mL avec du sérum physiologique NaCl 0.9 %, conservé à +4°C au maximum une semaine. La profondeur de l'anesthésie a été mesurée en testant les réflexes de l'animal, notamment d'une phalange de la patte postérieure, le réflexe pupillaire et le mouvement des vibrisses. Au début de l'expérience, l'animal est placé sur une couverture chauffante thermostatée, et sa température est maintenue à 37°C pendant tout la durée de la chirurgie grâce à un thermomètre rectal. Pour maintenir la sédation, l'équivalent d'un tiers de la dose initiale était réinjecté toutes les heures à l'animal, ou en cas de signe de réveil (réflexe positif au test du pincement de la patte par exemple). Si ce mélange était parfaitement adapté aux animaux témoins, chez lesquels je n'ai obtenu aucune perte, il a malheureusement induit un très fort taux de mortalité chez les animaux ob/ob obèses.

6.2. Chirurgie

Afin de pouvoir étudier le BO grâce à l'imagerie optique fonctionnelle, il est nécessaire d'exposer la surface du tissu pour pouvoir l'éclairer. Cette technique, largement utilisée au laboratoire, a été décrite de façon très précise (Chery et al., 2011). La souris, après anesthésie, a le dessus du crâne rasé pour éviter toute contamination ou déchet pendant l'imagerie. Elle est placée dans un appareil stéréotaxique adapté (Narishige, Japan) comprenant une barre de gueule et des barres d'oreille garantissant l'immobilité totale de l'animal pendant l'imagerie. La peau est retirée, la surface du crâne est découverte et nettoyée des poils et des tissus qui sont reliés à l'os. Si chez la souris la dure-mère n'est pas très épaisse, l'os du crâne au-dessus du BO nécessite en revanche d'être affiné puis retiré pour permettre la mise en place d'une fenêtre optique. L'affinage nécessite une certaine délicatesse et l'emploi d'une fraiseuse est par exemple à proscrire. Il convient d'utiliser de préférence une lame de scalpel et de gratter l'os par passages successifs, toujours dans le même sens. Cette manœuvre produisant de la chaleur et des micro-saignements, l'os doit être régulièrement refroidi et protégé par l'utilisation des éponges de gélatine imbibées d'eau distillée.

Une fois les vaisseaux sanguins visibles à travers l'os, une ouverture peut être tracée puis découpée à l'aide de la pointe du scalpel. De l'eau physiologique est appliquée et lorsque l'os devient lâche et désolidarisé du reste du crâne, il peut être soulevé délicatement en glissant la pointe du scalpel parallèlement sous l'os, en prenant garde à ne pas endommager la dure-mère et les vaisseaux sanguins adjacents. Une fois l'os enlevé, les tissus qui sont exposés ne sont plus maintenus et bougent sous l'effet de la respiration et des pulsations cardiaques, ce qui complique l'imagerie. En outre, le contact direct avec l'air peut assécher et endommager les tissus. La construction d'une fenêtre optique permet de maintenir et protéger les tissus exposés en créant une couche imperméable et plane au-dessus du BO (interface optique plane) à l'aide d'une solution d'agar tiède à 1% (Select Agar, Sigma Aldrich, St Louis, USA). L'ensemble est recouvert d'une fine lamelle de verre adaptée à la taille de la

craniotomie, ce qui permet de limiter l'hétérogénéité des angles d'incidence et de réflectance des photons. En cas de mauvais positionnement, la lamelle et l'agar peuvent être changés durant l'expérience sans endommager les tissus.

6.3. Odeurs

L'hexanal, le butyraldéhyde et l'huile minérale servant à diluer les odeurs ont tous été achetés chez Sigma Aldrich. L'odeur d'amande utilisée est l'arôme d'amande amère (Vahiné) de supermarché.

6.4. Stimulation olfactive

Pour appliquer un stimulus olfactif qui soit reproductible d'un animal à l'autre, il est nécessaire de limiter au maximum la variabilité de certains paramètres : concentration de l'odeur, pression délivrée, volume délivré, temps de la stimulation... C'est pourquoi nous avons automatisé la tâche à l'aide d'un système de perfusion que nous avons transformé en olfactomètre (système Valvebank II, AutoMate Scientific, U.S.A). Le dispositif est relié à un compresseur qui produit le flux d'air et dont la pression de sortie est réglée par un manomètre à 1 psi (6894 Pa ou 70.3 g/cm²). La stimulation olfactive est effectuée en plaçant un rectangle de papier-filtre imbibé de 50 µl de solution odorante (voie 'odeur' qui contient de l'arôme d'amande, ou de l'hexanal) et un filtre uniquement imbibé d'huile minérale (voie dénommée 'contrôle' ou 'blanc', pour la distribution d'air avant et après chaque stimulation olfactive) dans des tubes en verre. Lorsque la stimulation commence, le compresseur envoie l'air pur, ou additionné d'odeur, aux narines de la souris par l'intermédiaire de tubulures en téflon. Deux types d'enregistrements sont réalisés au cours de l'expérience : i) les enregistrements « contrôles » ou « blancs » dans lesquels seul de l'air est envoyé pendant 20s vers les narines de l'animal ; ii) les enregistrements « odeur », décomposés dans le temps en 5s d'air + 10s d'odorant + 5s d'air. Pour permettre un timing aussi précis, la sortie de chaque tube est contrôlée par une valve solénoïde dont l'ouverture et la fermeture sont pilotées par ordinateur. Nous avons vérifié que le diamètre des zones détectées correspond globalement aux dimensions glomérulaires (diamètre d'au moins 80 µm). Cette procédure permet d'éliminer une activité aspécifique, notamment due à des micro-saignements qui créent un faux signal positif.

6.5. Acquisition des images

Outre l'olfactomètre, il faut disposer du matériel adéquat pour synchroniser stimulation olfactive, illumination du BO et enfin acquisition et traitement des images. Nous allons décrire en détail chaque élément de ce dispositif, qui a été mis au point au sein de notre équipe notamment par Barbara l'Heureux et Romain Chery, sous la supervision de Frédéric Pain et Hiram Gurden, et qui a fait l'objet d'une publication (Chery et al., 2011). Il est à noter que ce dispositif est placé sur une table

anti-vibration (Technical Manufacturing Corporation, USA), toujours dans le but de réduire au maximum les artefacts de mouvement lors des enregistrements.

6.6. Microscope

Nous avons utilisé un stéréomicroscope à épifluorescence (MZ 16 FA, Leica Microsystems, Allemagne) pour visionner en temps réel l'activité du BO chez un animal anesthésié. Il est équipé d'un diaphragme permettant de concilier profondeur de champ suffisante pour détecter le maximum de glomérules et illumination nécessaire à la détection de faibles variations des signaux optiques intrinsèques.

6.7. Source lumineuse

Pour éclairer le BO, nous avons choisi une lampe Tungstène-Halogène à alimentation stabilisée (LOT-Oriel, Massy, France) et à puissance réglable (de 1 à 200 W), dont la sortie est un halo lumineux fibré fixé sur l'objectif du stéréomicroscope. Une roue à filtre motorisée (Thorlabs, USA) permet de modifier les longueurs d'onde à la volée selon les étapes de l'expérience. Nous avons utilisé principalement deux longueurs d'onde pour caractériser l'activité de surface du BO :

-un filtre vert à 540 nm, permettant principalement la visualisation de la vascularisation dorsale du BO et une mise au point très fine au niveau de la couche glomérulaire grâce à l'absorbance élevée des artérioles superficielles remplies d'oxyhémoglobine.

- un filtre rouge à 630 nm, permettant de réaliser la cartographie fonctionnelle du BO. Le signal observé lors de l'illumination traduit principalement les changements de volume sanguin et les différents niveaux de saturation de l'oxygène en hémoglobine.

6.8. Camera

Quels que soient les filtres utilisés, nous avons enregistré les images à l'aide d'une caméra Orca-ER (Hamamatsu Photonics, Japon) équipée d'un dispositif de transfert de charge (CCD : Charge-Coupled Device), un capteur constitué d'une matrice de 1344 x 1024 pixels photosensibles carrés de 6.45 μm de côté. La sensibilité de ce capteur est comprise entre 400 et 700 nm du spectre de longueurs d'onde, ce qui correspond aux longueurs d'onde que nous avons utilisées dans nos expériences. Cette caméra dispose d'une dynamique (rapport entre le maximum du signal accumulé sur un pixel et le bruit de lecture) permettant de détecter des variations relatives de 1 pour 1000 sur un pixel. En configurant la luminosité de telle sorte que les pixels atteignent leur saturation maximale, nous avons

été en mesure d'utiliser cette dynamique pour percevoir de très faibles variations dans les signaux enregistrés.

6.9. Logiciel d'acquisition

Le pilotage du dispositif d'imagerie ainsi que l'enregistrement des données a été assuré par un logiciel développé C++ par Françoise Lefebvre, ingénieure de recherche au laboratoire IMNC, ou par pilotage par le logiciel Micromanager avec les routines développées par Frédéric Pain. Ces logiciels permettent de synchroniser les différents éléments du dispositif expérimental en déclenchant l'ouverture de différentes vannes de l'olfactomètre selon les phases d'un essai, en sélectionnant le filtre de couleur adéquat et en activant l'acquisition d'images au moment opportun. A la fin de chaque essai, la carte d'activation est affichée, permettant de vérifier le bon déroulement de la séance d'imagerie. Ce logiciel dispose également de fonctions permettant de calculer les décours temporels de l'activation au sein d'une zone d'intérêt définie.

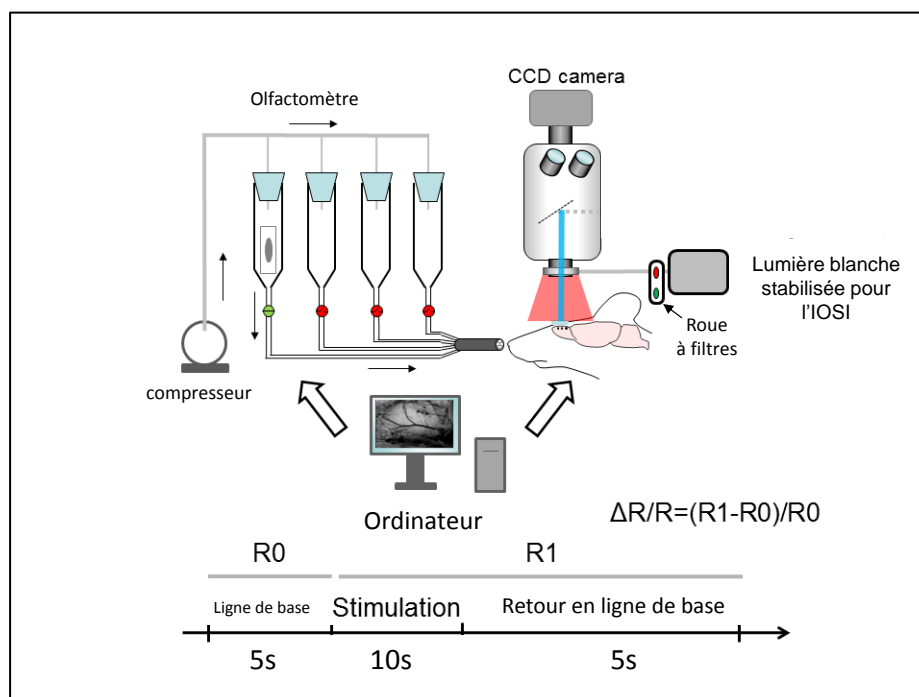


Figure 2.5 Dispositif expérimental d'imagerie optique in vivo et séquences d'acquisition. Le BO de la souris est illuminée successivement par différentes longueurs d'onde émanant néanmoins de la même source lumineuse. Les images anatomiques (longueur d'onde verte, 540 nm) sont obtenues directement. Les images fonctionnelles des cartes olfactives sont obtenues par le calcul de la variation de la réflectance (ΔR) lumineuse captée par la caméra CCD, en comparant l'intensité des pixels

pendant la période « stimulation » et « retour en ligne de base » par rapport à la ligne de base. Figure modifiée de Chery et al., 2011.

7. Electrophysiologie chez la souris éveillée

7.1. Implantation des électrodes d'enregistrement à demeure

Afin d'étudier la plasticité de la représentation temporelle chez les souris obèses, nous avons décidé d'utiliser le protocole comportemental de discrimination olfactive régulièrement utilisé au laboratoire et ayant fait l'objet de nombreuses publications. L'étude et l'enregistrement de l'activité neuronale nécessite l'implantation chronique d'électrodes d'enregistrement du LFP dans le BO. Une des étapes cruciales au bon déroulement de cette expérience est l'utilisation d'un anesthésique adéquat. Romain Chery, ayant réalisé sa thèse au laboratoire IMNC avant moi, a conduit de nombreux essais pharmacologiques afin de déterminer le mélange le plus adapté au maintien de l'anesthésie et au réveil des animaux (Chery et al., 2014). Le mélange suivant, que j'ai utilisé au début de mes expériences, lui a permis d'obtenir de très bons résultats : Injection intraperitonéale (i.p) d'un volume de 0.1 mL / 10g d'une solution de kétamine (75mg/kg) et de médétomidine (0,425 mg/kg). La solution mère a été préparée à partir de 1.5mL de kétamine (Imalgène 500 ®, Merial, France) et de 0.54mL de médétomidine (Domitor®, Pfizer, France) ajustée à un volume total de 10 mL avec du sérum physiologique NaCl 0.9 %, conservé à +4°C. A la fin de l'implantation, une injection i.p d'atipémazole (Antisedan®, Janssen, France), un antagoniste des récepteurs adrénergiques, permettait de réveiller aisément les animaux, même après une anesthésie de plusieurs heures. Si ce mélange était parfaitement adapté aux animaux témoins, chez lesquels je n'ai obtenu aucune perte, il a malheureusement induit un très fort taux de mortalité chez les animaux obèses.

J'ai donc adapté mon dispositif expérimental pour maintenir les animaux anesthésiés pendant toute la durée de la chirurgie en utilisant un anesthésique gazeux, l'isoflurane. Je reviendrais par la suite sur les raisons de ce choix. Le cadre stéréotaxique s'est vu adjoindre un masque sur mesure permettant de maintenir le museau de l'animal tout en diffusant le gaz anesthésique directement dans ses narines. Un compresseur de dioxygène branché sur un vaporisateur d'isoflurane permettait de diffuser un flux constant d'anesthésique dans le tuyau d'arrivée du masque, et un tuyau de sortie était relié à un dispositif permettant de capter les vapeurs d'isoflurane excédentaires. Les dosages utilisés lors de mes chirurgies correspondaient à ceux recommandés par la littérature (Gargiulo et al., 2012) et étaient les suivants : 4.5% d'isoflurane pour un débit d'O₂ de 1L/min pendant l'induction de la

sédation et 2.5% d'isoflurane pour un débit d'O₂ de 1L/min pendant le maintien de la sédation. La profondeur de l'anesthésie a été mesurée en testant les réflexes de l'animal, notamment le pincement de la patte, le réflexe pupillaire et la stimulation des vibrisses. Au début de l'expérience, l'animal est placé sur une couverture chauffante thermostatée, et sa température est maintenue à 37°C pendant toute la durée de la chirurgie grâce à un thermomètre rectal. À la fin de l'expérience, l'animal est retiré du cadre stéréotaxique mais son museau reste maintenu dans le masque à oxygène : la quantité d'isoflurane est diminuée progressivement mais le flux d'O₂ délivré reste constant pour éviter tout risque d'hypoventilation. Le réveil intervient après quelques minutes et l'animal est replacé dans sa cage avec un peu de nourriture et d'eau, dans une pièce chauffée à 28 °C.

La mise en place de cette technique a permis d'augmenter de façon très significative la survie des animaux obèses, tout en étant également très bien tolérée par les témoins.

L'électrode (diamètre 125 µm, acier inoxydable, Plastic One) a été positionnée dans le BO avec les coordonnées stéréotaxiques suivantes : 4.5 mm antérieur au Bregma, 1 mm en latéral. L'électrode est ensuite descendue au niveau de la couche granulaire (environ 0.8 à 1.1 mm de profondeur) en utilisant en temps réel les caractéristiques électrophysiologiques du signal, comme une puissante activité de la bande gamma (60-130 Hz) ainsi qu'une modulation respiratoire prononcée. L'électrode de référence était reliée à une vis crânienne localisée au-dessus de la portion postérieure de l'hémisphère cérébral contralatéral au site d'implantation. Le connecteur de l'électrode implantée a été fixé sur la tête de la souris à l'aide de ciment dentaire. Une période de deux semaines a été laissée aux animaux pour récupérer de l'intervention chirurgicale avant de débuter les protocoles de comportement.

7.2. Dispositif d'électrophysiologie

Durant tous nos enregistrements, les souris étaient connectées au dispositif d'enregistrement via une attache branchée sur le connecteur implanté. L'activité monopolaire a été acquise via un script personnalisé DasyLab (IOTECH, U.S.A) pilotant un amplificateur XCellAmp 64 (Dipsi, France) couplé à un système USB DaqBoard 3000 (IOTECH, U.S.A). Le signal a été échantillonné à 2000 Hz, amplifié (x2500) et des filtres numériques (0.1-300 Hz) ont été appliqués. Les odeurs ont été délivrées via un olfactomètre automatisé (système Valvebank II, AutoMate Scientific, U.S.A). La stimulation olfactive est effectuée en plaçant un rectangle de papier-filtre imbibé de 50µl de solution odorante dans des tubes en verre. Le dispositif est relié à un compresseur qui produit le flux d'air et dont la pression de sortie est réglée par un manomètre à 1 psi (6894 Pa ou 70.3 g/cm²). Les expériences ont pris place dans une cage de Faraday.

7.3. Analyse des signaux LFP

Le caractère transitoire de ces signaux, de par la rapidité des changements de fréquence et de puissance des oscillations, requiert une analyse adaptée. Le calcul d'une moyenne de ces valeurs sur une durée importante (plusieurs secondes) ne permet pas de suivre ces transitions et n'offre qu'une vision édulcorée du signal brut. Notre méthode de traitement du signal, basée sur une décomposition des oscillations du LFP en temps et en fréquence par une analyse en ondelettes, nous a permis de suivre de manière précise les variations transitoires du signal (Roux et al., 2007). Grâce à cette analyse nous avons obtenu sans *a priori* (pas de filtrage spécifique dans une bande de fréquence donnée) la fréquence et la puissance instantanée pour chaque oscillation significative. Ce type de traitement nous permet de suivre de manière fine les activités et leur éventuel changement de bande de fréquence dans les différentes conditions.

Les signaux bruts enregistrés sont stockées dans une base de données MySql et visualisés et traités grâce au logiciel OpenElectrophy (<http://neuralensemble.org/trac/OpenElectrophy>) développé par Samuel Garcia au Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon (CNRS-UMR-5292, INSERM U1028) (Garcia and Fourcaud-Trocmé, 2009). Ils sont dans un premier temps triés visuellement, tout signal comportant un artefact est éliminé.

Nous avons concentré notre analyse sur les réponses oscillatoires obtenues en présence d'odeur. Le potentiel de champ local tel que nous l'enregistrons dans le BO est un signal complexe composé d'oscillations à différentes fréquences et qui apparaissent de façon transitoire. L'analyse temps-fréquence avec les ondelettes de Morlet (Tallon-Baudry and Bertrand, 1999) est particulièrement adaptée et a été validée pour le LFP dans le BO (Ravel et al., 2003). Elle permet de dissocier de façon précise les composantes fréquentielles et temporelles. Afin de déterminer les bandes de fréquence d'intérêt, nous avons utilisé des représentations temps-fréquence du signal (voir partie 4.9.3) qui permettent de visualiser les caractéristiques des oscillations sans *a priori*. En utilisant OpenElectrophy et Python, nous avons représenté les cartes temps-fréquence pour chaque essai et les cartes temps-fréquence moyenne par séquence (avec une fréquence $f/rf = 1,5$, une résolution temporelle de 3 ms (300 Hz) et une résolution de fréquence de 1 Hz). Ces cartes permettent de visualiser au cours du temps la puissance des oscillations sur tout le spectre de fréquence d'intérêt.

Afin de pouvoir comparer les réponses aux odeurs et leur variation dans nos différents protocoles, nous calculons grâce à un script écrit sous Python la puissance moyenne des oscillations (moyenne \pm 2 SEM) dans des pavés temps-fréquences parfaitement définis. Après visualisation des données, nous avons choisi pour l'analyse les bandes de fréquences suivantes : 15-40 Hz (bêta) et 60-100 Hz (gamma). Nous avons donc comparé les deux bandes différentes avant et pendant odeur chez chaque animal. Nous calculons la puissance de chacune de ces bandes pendant la seconde que dure la stimulation odorante et nous comparons ces résultats à la puissance des oscillations pendant une durée de une seconde allant de la seconde -2 à la seconde -1 avant la stimulation.

8. Test comportemental de discrimination olfactive (Go / No Go)

Nous avons utilisé une tâche de discrimination olfactive de Go / No Go pour mettre en évidence les éventuelles différences de capacité de discrimination et de sensibilité olfactive chez des groupes d'animaux différents (Martin et al., 2004a). Au cours de cette expérience, les animaux sont exposés à 2 odeurs structurellement différentes qui vont chacune acquérir une valence différente grâce à l'apprentissage. La présentation de l'odeur renforcée (Go) est associée à un renforcement positif (distribution d'eau) alors que l'odeur non renforcée (No Go) est associée à un renforcement négatif (pas d'eau, et pénalité de temps avant la présentation d'une nouvelle odeur).

Les souris sont restreintes en eau tout au long de la durée de l'expérience (elles reçoivent 1 ml par jour à la fin de l'expérience journalière). Un essai est initié lorsque l'animal lui-même déclenche la stimulation olfactive. Cet événement est suivi de l'échantillonnage de l'odeur, la prise de décision, le déplacement de l'animal et enfin l'ingestion ou non de la solution proposée.

L'enceinte expérimentale est une boîte rectangulaire de 18 cm de long, 18 cm de large et 30 cm de haut (Habitest - Coulbourn Instruments) contrôlée par le logiciel GraphicState (Coulbourn Instruments). Sur une des parois de la cage se trouvent un point d'échantillonnage des odeurs et un port délivrant une petite quantité de liquide. Le point d'échantillonnage est relié à un olfactomètre couplé à un dispositif de détection optique qui permet à la souris de déclencher elle-même la stimulation olfactive lorsqu'elle y présente son museau. Ce système permet d'introduire l'odeur dans un flux d'air vecteur déodorisé sans changement de pression. L'apparition de l'odeur est rapide (environ 50 ms) et le flux d'air continu permet d'évacuer l'odeur entre deux essais.

Avant le test, les animaux sont soumis à une période d'habituation où ils découvrent le dispositif expérimental et apprennent à associer une odeur neutre (eugénol 10%) à une récompense hydrique : une seule odeur est présentée et elle est renforcée dans 100% des cas.

Après cette période d'habituation, le test d'apprentissage est lancé. On utilise l'hexanal (10%) en tant qu'odeur renforcée (Go), et le butyraldéhyde (15%) en tant qu'odeur non renforcée. La

présentation des 2 odeurs est aléatoire mais équivalente (chaque odeur est présentée autant de fois que l'autre durant une séance).

L'eau est distribuée uniquement quand l'animal active le port de récompense dans un laps de temps prédéfini (6 secondes) après la délivrance de l'odeur Go. La latence de réponse est acquise par le logiciel de contrôle. On la définit comme le temps séparant l'entrée dans le point d'échantillonnage des odeurs de l'entrée dans le port à récompense. Les paramètres de chaque essai, bon ou mauvais, sont acquis.

La tâche de discrimination olfactive inclut 3 étapes successives d'apprentissage. La première étape (où les animaux sont « débutants ») consiste à apprendre à l'animal que l'eau n'est pas toujours disponible après échantillonnage des odeurs (50% des essais). Lors de cette étape, le comportement des animaux est indépendant des odeurs présentées. Les latences de réponse sont similaires pour les 2 odeurs. Pendant la seconde étape «intermédiaire», les souris expriment une réponse différentielle aux stimuli présentés, et les latences de réponse deviennent progressivement et significativement différentes. Après la présentation d'une odeur renforcée (Hexanal à 10 %), l'animal se déplace très rapidement vers le port à récompense, et la latence de réponse diminue. A l'inverse, après la présentation de l'odeur non renforcée (Butyraldéhyde à 15%), l'animal ralentit ou s'immobilise, augmentant ainsi la latence de réponse. Un essai Go est correct si l'animal est détecté dans le port à récompense en moins de 6 sec, un essai No Go est correct si l'animal n'est pas détecté dans le port pendant les 6 sec suivant le début de la stimulation (voir figure 2.6). On considère que l'animal a correctement appris la tâche lorsqu'il est parvenu au critère d'apprentissage que nous avons fixé à 90% de bonnes réponses donc au moins 80% de bons essais No Go pendant au moins 2 jours consécutifs. Chaque session de test dure 40 min, ou est arrêtée au bout de 40 essais, le critère est donc atteint quand les animaux font moins de 4 ± 2 erreurs sur un total de 40 essais. Les réponses sont analysées par blocs de 20 essais, chacun étant considéré comme une séance. Les valeurs sont reportées sur une courbe de latence qui présente la latence moyenne des deux odeurs pour chaque bloc d'essais au cours des séances.

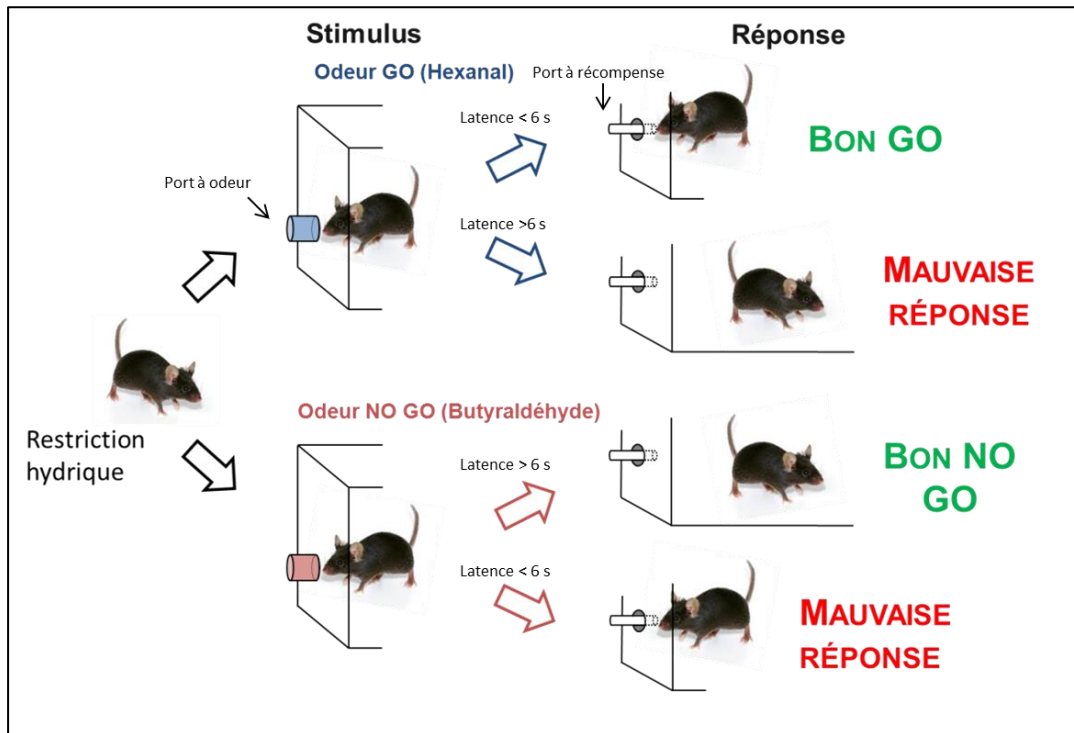


Figure 2.6. Principe de la tâche de discrimination olfactive de type Go/No Go



Figure 2.7. Souris obèse effectuant la tâche de discrimination olfactive. A gauche : l'animal portant une électrode dans le BO à demeure et connecté par un câble à l'amplificateur échantillonne l'odeur présentée lors d'un essai. La stimulation olfactive est déclenchée quand l'animal met le museau dans le port à odeur (O), qui est lui-même relié à un olfactomètre. La flèche indique le sens de déplacement de la souris pour aller prendre sa récompense. A droite : La souris cherche sa récompense dans le port à récompense (R). La latence de réponse est le temps que l'animal met pour aller de O vers R après la présentation d'un stimulus olfactif.

9. Neurogenèse

9.1. Injections des marqueurs de la division cellulaire

Les expériences décrites dans ce paragraphe ont été réalisées avec l'appui technique d'Aurélien Genoux (CDD, ingénieure d'étude techniques biologiques IMNC) en collaboration avec Sophie Scotto-Lomassese (Maître de Conférences à l'université Paris 6, Institut du Fer à Moulin, INSERM UMRS-U839, Paris). Pour pouvoir étudier la neurogenèse chez des animaux adultes, les souris ont reçu 3 injections intra-péritonéales de Bromodéoxyuridine (BrdU, 50mg/kg, Sigma-Aldrich), un marqueur exogène de la division cellulaire, à deux heures d'intervalle chacune. Après 21 jours, les animaux ont été fixés par perfusion intracardiaque (4% de paraformaldéhyde dans 0.1M de PBS (Phosphate-Buffered Saline, pH 7.4, GIBCO).

9.2. Analyse des tissus

Les cerveaux ont été post fixés à 4°C pendant la nuit dans la même solution de paraformaldéhyde et ensuite cryoprotégés pendant 2 jours dans une solution de 30% de sucrose/PBS. Des coupes coronales de 50 µm d'épaisseur ont été préparées grâce à un cryomicrotome (Microm Microtech). Six séries de coupes allant du BO jusqu'à la SVZ (Zone Sous-Ventriculaire) et séparées de 250 µm ont été collectées dans du PBS. Pendant la procédure, les coupes des deux hémisphères ont été séparées dans différents puits et seul l'un des deux hémisphères a été utilisé pour l'immunohistochimie. Une série du BO contenait de 5 à 6 coupes coronales, la plus rostrale contenant des cellules mitrales visibles et la couche plexiforme externe, et la plus caudale précédant immédiatement le BO accessoire. Une série de la SVZ est constituée de 5 coupes avec les deux hémisphères, commençant avec une ouverture franche du ventricule latéral et s'achevant immédiatement avant la fusion du ventricule latéral avec la partie dorsale du troisième ventricule. Les tissus ont été conservés à -20°C dans une solution cryoprotectrice (30% d'éthylène glycol et 30% de glycérol dans 0.12 M de tampon phosphate (PBS)), à moins d'une utilisation immédiate.

Les coupes flottantes ont été rincées dans 3 bains successifs de PBS avant l'immunohistochimie. Pour réduire la détection non spécifique, tous les bains et les incubations d'anticorps ont été réalisés dans une solution bloquante contenant 2 g/L de gélatine (Merck) et 0.25% de triton X100 dans du PBS. Pour le marquage au BrdU, les coupes de BO ont été exposées à de l'HCl 2N pour une hydrolyse d'acides deoxyribonucléiques à 37°C pendant 30 min. Les coupes ont ensuite été incubées avec des anticorps anti-BrdU (rat, 1 :400, AbDserotec OBT0030) et des anticorps anti-NEUN (souris, 1:500; Santa Cruz) pendant 48 heures et à 4°C. Les anticorps secondaires d'âne Cy3-conjugué anti-rat (1:800; Jackson ImmunoResearch) et les anticorps d'âne Alexa 488 conjugué

anti-souris (1:500; Molecular Probes) ont été appliqués aux coupes pendant 2h à température ambiante. Pour la détection du marqueur de cycle cellulaire endogène Ki67, les coupes de la SVZ ont été incubées avec un anticorps anti-Ki67 (lapin, 1:1000; Novacastra, NCL-Ki67p) durant 48 h à 4°C et révélées par des anticorps secondaires d'âne Cy3-conjugué anti-lapin (1:800; Jackson ImmunoResearch) pendant 2 heures à température ambiante. Toutes les coupes ont été montées sur une lamelle de verre dans du Mowiol (10%, Calbiochem) et du Dabco (2.5%, Sigma).

9.3. Protocole d'analyse et de comptage des cellules

Les images ont été obtenues sur un système confocal Leica SP5, équipé de lasers avec Argon et Diode DPSS 561. Les images ont été acquises à une résolution de 1024 x 1024 pixels.

Le logiciel Leica Application Suite Advanced Fluorescence (LAS AF) a permis de reconstruire automatiquement des mosaïques d'images montrant la totalité des coupes du BO et de la SVZ à partir de tranches optiques prises à la même profondeur Z ; ce niveau Z a été choisi à partir du milieu de chaque coupe pour assurer l'homogénéité et la force de la fluorescence dans toutes les zones de la mosaïque. Pour le marquage NeuN-BrdU du BO, les fluorochromes Alexa 488 et Cy3 ont été séquentiellement excités à des longueurs d'onde de 488 et 561nm, et les photons d'émission ont été collectés par 2 détecteurs ayant une plage/spectre de détection de 500-550nm et 600-680 nm, respectivement. Il convient de préciser que l'autofluorescence issue des granules de lipofuscine, présentes dans les corps cellulaires de la couche periglomerulaire du BO, est détectée dans tout le spectre de longueur d'onde et peut être observée même sur des animaux âgés de 2 mois (Whitman and Greer, 2007). Pour distinguer sans équivoque le signal émis par les granules du marquage au BrdU lorsque l'on excite le tissu avec une longueur d'onde de 488nm, un troisième détecteur collectant spécifiquement les émissions d'autofluorescence comprises entre 700 et 800 nm a été mis en place.

Pendant l'analyse, tous les noyaux ayant montré des motifs (« patterns ») de fluorescence similaires dans les 3 détecteurs ont été assimilés à des granules de lipofuscine et ont été de ce fait éliminés lors du comptage.

La quantification a été faite manuellement à l'aide des plugins « Cell Counter » du logiciel Fiji. Les cellules BrdU+ dans la couche GCL et PGL ont été quantifiées à partir d'une coupe optique de chaque image mosaïque d'une série du BO. Les progéniteurs présents dans la SVZ étant regroupés de façon très dense, le nombre de cellules Ki67+ a été estimé à partir de deux coupes optiques de chaque série de la SVZ. Dans tous les cas, les résultats sont exprimés en tant que moyenne (+/- SEM) du nombre de cellule par mm². Pour déterminer le phénotype neuronal des cellules néoformées dans le BO, la colocalisation des marqueurs NeuN et BrdU a été évaluée à la fois dans les couches GCL et PGL (de 180 à 330 et 40 à 100 cellules analysées par animal, respectivement).

Les coupes ont été analysées en aveugle jusqu'à la fin de l'analyse des données. Les différences entre les groupes expérimentaux ont été analysées par Sophie Scotto avec le test Mann-Whitney sur le logiciel GraphPad Prism. Dans tous les cas, $p < 0.05$ était considéré comme statistiquement significatif.

10. Quantification des marqueurs moléculaires pour estimer l'inflammation intrabulbaire chez les souris obèses

Ces mesures ont été effectuées avec l'aide technique d'Aurélien Genoux et avec l'utilisation de la plateforme de RTPCR (Reverse Polymerase Chain Reaction) de l'équipe « Régulation de la glycémie par le système nerveux central » dirigée par Christophe Magnan au sein du laboratoire de Biologie des Fonctions Adaptatives (CNRS UMR8251, Université de Paris Diderot) et avec l'aide de Nadim Kassis, l'assistant ingénieur sur la plateforme. Nous avons voulu connaître l'état de l'inflammation du BO chez les souris ob/ob ($n=10$) en effectuant une série de quantification d'ARN messagers et en les comparant à des animaux témoins ($n=10$) pour des marqueurs classiques de l'inflammation au niveau des cellules gliales, incluant la GFAP, GLAST, GLT1 pour les astrocytes, et IBA1, MAC1-CD11b, ED1-CD68 pour la microglie. Nous avons également quantifié un marqueur des OSN, l'OMP.

Les RNA totaux ont été extraits des BO des souris en utilisant le kit RNeasy Lipid (Qiagen). La concentration des RNA est mesurée par densité optique à 260 nm. L'intégrité des RNA est confirmée par la détection des bandes 18S et 28S bands après électrophorèse en gel d'agarose-formaldehyde. La qualité des RNA est vérifiée par densité optique OD 260nm / OD 280nm. Pour enlever la contamination par des résidus de RNA, les échantillons ont été traités par une solution DNase RNase-free (Qiagen) et purifié en mini-colonne Rneasy (Qiagen). 4 µg de RNA total RNA de chaque échantillon a été transcrit inversement avec M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, life technologies) utilisant des amorces hexamères. Les amorces oligonucléotidiques ont été choisies par rapport aux gènes cibles et pris dans une banque de séquences génomiques murines. Les séquences sens/antisens sont les suivantes: IBA1_m_R_S ggattgcaggaggagaaaa / IBA1_m_R_AS tgggatcatcgaggaatt ; ED1-(CD68)_m_S gcccaaggaacaggaaga / ED1(CD68)_m_AS gtggctgtaggtgtcatcgtgaa ; MAC1(CD11b)_m_S gccttgtgtcatggcttaa / MAC1(CD11b)_m_AS gctggaccacactctgtccaaa. Deux amorces standard ciblant des gènes ubiquitaires dits de ménage (housekeeping) ont été utilisés pour normaliser les résultats : TBP_m_S ggggagctgtatgtgaagt TBP_m_AS ccaggaaataattcttggtca ; rpL19_m_S gggcaggcatatgggcata / rpL19_m_AS ggcggtcaatcttcttggtgatt.

La PCR quantitative est effectuée pour la partie amplification dans un système de détection LightCycler 480 detection (Roche) en utilisant le kit « LightCycler FastStart DNA Master plus SYBR Green I » (Roche). 40ng des RNA ont été inversement transcrit. Toutes les réactions et les mesures biochimiques ont été doublées. Les conditions sont: 95°C pendant 10 min, suivi de 40 cycles à 95°C pendant 10 sec, 10 sec à 60°C et 10 sec à 72°C. La normalisation et la quantification des variations es effectuée en utilisant la moyenne de deux 'house keeping genes' ubiquitaires: rpL19 et TBP. Des détails supplémentaires peuvent être trouvés dans l'article référence de Pfaffl M. et al. (Nucleic Acids Research, 2002, vol. 30, No. 9 e36).

Comme nous sommes en présence d'un nombre très important de transcrits amplifiés et d'un nombre conséquent de souris, nous avons appliqué une comparaison par un test de Student t pour échantillons non appariés pour comparer les valeurs Δ de variation des transcrits cibles chez les ob/ob par rapport aux témoins.

Partie 3 : Résultats

Après avoir présenté les caractéristiques phénotypiques et physiologiques générales des modèles d'animaux obèses utilisés pour mes travaux de thèses et décrit l'apprentissage associatif de la valence alimentaire et appétitive de l'odeur d'amande, je décrirai en premier lieu les résultats liés à nos expériences d'imagerie MEMRI et à la caractérisation de la comparaison par SPM de la différence de répartition spatiale de l'activité dans le BO. Je présenterai alors les résultats complémentaires avec études en neurogenèse olfactive et en RtPCR quantitative pour expliquer, au moins en partie, les différences de résultats obtenus entre souris obèses et souris témoins en imagerie. La dynamique temporelle dans le BO sera alors abordée avec la présentation des résultats de comportement de discrimination olfactive et des enregistrements concomitants des activités oscillatoires.

1. Phénotype et physiologie des souris obèses

1.1. Souris déficientes en leptine depuis la naissance, souris ob/ob

Souris témoins pour les ob/ob

Dans la littérature, ce sont classiquement les ob/+ qui sont utilisées même si nous n'avons pas relevé d'études fonctionnelles strictes indiquant une différence de fonction cérébrale entre hétérozygotes ob/+ et homozygotes sauvages +/+. Nous nous sommes également confrontés au fait que la société Janvier ne fournit les ob/+ qu'après génotypage puisque les commandes d'hétérozygotes sont un mélange de +/+ et de +/-, et que les ob/ob de la même portée sont sélectionnées uniquement visuellement puisqu'elles sont déjà plus lourdes à 5 semaines. Il faut donc être vigilant sur ce point quand on commande ces souris hétérozygotes chez les fournisseurs classiques. Les souris témoins que nous avons utilisées sont toutes des C57BL/6J mâles qui sont le fond génétique des ob/ob. Nous les avons achetés indépendamment des portées de souris obèses ob/ob pour ne pas tomber dans le problème d'une hétérogénéité de nos contrôles qui auraient été un mélange de +/- et de +/+.

Poids, glycémie et prise alimentaire

Classiquement, l'utilisation d'un modèle animal obèse implique le suivi régulier, au cours du temps, de la masse pondérale et de plusieurs paramètres métaboliques circulants. Toutefois, nous avons décidé de limiter au maximum la prise de poids des animaux ob/ob afin d'empêcher le développement d'une obésité morbide par hyperphagie, celle-ci pouvant entraver le déplacement des animaux pendant les expériences de comportement et gêner la mise en place des animaux au cours de l'imagerie dans l'aimant. Si les souris ob/ob sont laissées ad lib, elles mangent beaucoup plus (5.3 ± 0.2 g/jour, n=13) que leur témoins (3.7 ± 0.1 g/jour, n=7), ce qui provoque une prise de poids très

rapide. Nous avons décidé de donner aux ob/ob un peu plus que le poids moyen de nourriture des témoins, environ 4g de nourriture par souris obèse par jour. Nous avons de plus maintenu le délai le plus court possible entre la fin de la période d'acclimatation en animalerie et la réalisation des expériences d'imagerie. De façon similaire, la restriction hydrique des animaux au cours de la tâche de discrimination olfactive a permis de maintenir un poids constant et similaire dans tous les groupes d'animaux réalisés.

Nous avons dans un premier temps vérifié que les différents paramètres physiologiques étaient en accord avec ceux décrits dans la littérature depuis les années 1960. Les souris ob/ob étant génétiquement déficientes en leptine, et de fait dès la naissance, le phénotype obèse apparaît très rapidement, et nous avons pu constater une différence de poids importante entre ces animaux ($46g \pm 3g$) et leurs homologues témoins ($24.6g \pm 1.5g$), pour des animaux âgés de 8 à 10 semaines.

Nous avons limité nos mesures de la glycémie, ce protocole étant stressant pour les animaux, notamment au cours des expériences de comportement. La glycémie est la quantité circulante de glucose. Dans des conditions physiologiques, lorsqu'un mammifère est à jeun, cette glycémie diminue de façon importante par rapport à l'état nourri où elle est très élevée et elle est considérée comme normale lorsqu'elle est comprise entre 0.7 et 1.2 mg/ml. Mesurée en début de matinée, la glycémie chez les souris nourries s'élevait à 2.5 ± 0.7 mg/ml ($n=5$) chez les ob/ob contre 1.9 ± 0.4 mg/ml ($n=7$) chez les témoins. A jeun, nous avons observé que les souris ob/ob ont une glycémie qui a baissé et qui atteint 1.2 ± 0.1 mg/ml ($n=5$) contre 1.1 ± 0.2 ($n=7$) aux témoins. Les comparaisons intragroupe pour les ob/ob et les témoins indiquent respectivement une différence significative dans les deux groupes nourris (test t de Student apparié, $t=4.24$, $p=0,01$ pour les ob/ob, $t=4.71$, $p=0,003$ pour les témoins) et la comparaison statistique intergroupe par test de t de Student non apparié à jeun n'indique pas de différence intergroupe ($t=1.66$, $p=0.13$). Ces données montrent que i) toutes les souris maintenues ad libitum ont une glycémie très élevée, ce qui remet en cause la pertinence de ce type de régime pour l'hébergement en animalerie ii) la glycémie chute de moitié chez toutes les souris à jeun pendant 17 heures iii) à jeun, dans nos conditions, avec des ob/ob d'âge jeune (8 semaines) auxquelles on délivre une nourriture en quantité légèrement supérieure aux témoins, nous n'observons pas d'hyperglycémie : celle-ci devient élevée chez des animaux plus âgés, comme observé dans la littérature (Wang et al., 2014). Les mêmes souris ob/ob d'âge jeune où la glycémie a été mesurée, ont été utilisées pour les tests comportementaux olfactifs spontanés (paragraphe 4).

1.2. Physiologie des souris rendues obèses par alimentation hypercalorique - hyperlipidique (Diet-Induced Obesity)

Souris témoins pour les obèses DIO

Pour les souris rendues obèses par alimentation hypercalorique, les témoins sont des animaux mâles de même souche (C57BL/6j) de même âge, et issues du même lot. Ces souris témoins sont dans des conditions de nutrition ad lib par nourriture standard et placées dans des cages distinctes par rapport aux souris sous régime hypercalorique.

Poids et glycémie

L'obésité des animaux DIO est induite par un changement dans l'alimentation. Malgré la richesse en glucides, en lipides et en protéines de cette dernière, 3 mois sont nécessaires en moyenne à l'obtention d'un phénotype similaire à celui des ob/ob (figure 3.1.). Les souris DIO ne consomment pas plus en quantité absolue (HFD+nourriture standard = 3.1 g/souris/jour; n=6 ; 2.2 g de nourriture hypercalorique pour 0.9 g de nourriture standard) que leur témoin (nourriture standard = 3.5 g/souris/jour, n=6) mais étant donnée les teneurs très élevées en lipides et glucides de la nourriture hypercalorique, elles prennent du poids. L'évolution du poids et de la consommation alimentaire ainsi que de la glycémie ont été suivis régulièrement pour s'assurer de la réussite du régime. Notre premier lot de souris nourri avec le régime 235 HF de SAFE diets n'a pas pris plus de poids par rapport aux animaux témoins, et ceci même après une tentative d'odorisation avec une odeur appétitive (Spray d'amande 5%). Nous avons ensuite utilisé le produit 230HF de SAFE diets qui s'est révélé efficace pour induire une obésité à long terme.

Après 14 semaines (figure 3.1.), les DIO pèsent en moyenne 44 ± 1 g (n= 12) contre 29 ± 1.15 g (n= 4) pour les animaux témoins. La figure 3.1 indique la prise de poids de notre second lot de souris DIO nourries au 230HF, mais la progression de poids a été similaire pour tous les groupes ultérieurs. Il est intéressant de noter que la prise de poids des DIO continue même après 14 semaines, alors que celle des animaux témoins semble se stabiliser en 10 semaines (conformément aux données indiquées par le fournisseur Janvier), même avec un accès ad libitum à la nourriture standard.

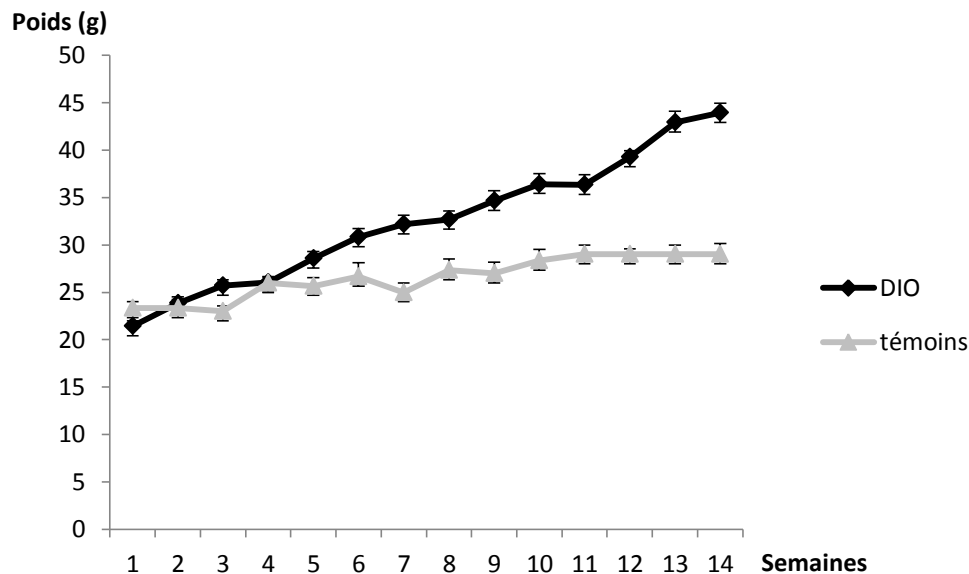


Figure 3.1 : Comparatif de l'évolution du poids de souris C57BL6 maintenues sous régime standard 'témoins', n= 4) et de souris C57BL6 ayant reçues un régime 230HF (DIO, n= 12) pendant 14 semaines. Chaque point indique la moyenne du poids +/- SEM .

Pour la glycémie, les DIO nourries présentent une glycémie de 1.64 ± 0.15 mg/ml (n=6) contre 1.49 ± 0.10 mg/ml (n=5) pour les témoins. A jeun, elle est de 1.17 ± 0.10 mg/ml pour les DIO contre 0.74 ± 0.04 mg/ml aux témoins. Les statistiques intragroupes indiquent une baisse de glycémie pour les DIO (t apparié=5.52 ; p=0.003) et les souris témoins (t apparié=5.81 ; p=0.004) et avec une différence de glycémie intergroupe à jeun (t non apparié=3.28 ; p=0.01). Même si la glycémie baisse chez les DIO à jeun, elles n'est pas aussi basse que chez les témoins, ce qui témoigne du fait qu'à trois mois de régime hypercalorique suivant notre protocole, les souris DIO ont des difficultés à réguler leur glycémie avec une disparité entre les souris testées, certaines étant à 0.8 mg/ml et d'autres à 1.24 mg/ml à jeun. Ces données sont similaires dans la littérature : par exemple Thiebaud et al. (2014) trouvent que le régime hypercalorique induit une glycémie à jeun de 1.3 mg/ml chez les DIO nourries pendant 6 mois. Nous sommes conscients que des tests métaboliques plus poussés auraient été nécessaires sur nos groupes de souris tel que le test de tolérance au glucose (GTT) pour détecter une éventuelle résistance à l'insuline et éventuellement déterminer un stage prédiabétique ou diabétique de nos souris DIO. De même, des tests sériques de leptine et d'insuline auraient été très utiles sur ces DIO. Cependant, par manque de temps (j'ai étudié les DIO en toute fin de thèse), nous n'avons pas pu effectuer ces tests et nous nous sommes plutôt basé sur la littérature pour ces aspects métaboliques. Ces souris ont été utilisées pour les tests de comportement spontané décrit dans le paragraphe 4.

2. Activité locomotrice

Nous avons voulu vérifier dans quelle mesure les déplacements spontanés des animaux obèses ob/ob et DIO étaient affectés au cours d'un cycle de 24h par rapport à des souris C57BL6. Les animaux ont été installés dans les cages individuelles de l'actimètre, où elles avaient accès à de la nourriture et à de l'eau ad libitum. Chaque cage est virtuellement décomposée en 9 parties de par le croisement des deux faisceaux de lumière infrarouges verticaux et deux faisceaux horizontaux, et chaque déplacement d'une partie à l'autre était détecté et répertorié comme un déplacement unique, fournissant une indication globale de l'activité des animaux au cours de ce cycle de 24h. Le cycle jour/nuit était identique à celui dont les animaux avaient l'habitude à l'animalerie, avec une forte augmentation de l'activité locomotrice en phase nocturne, responsable de la majorité du décompte des traversées de cage et de coupures de faisceaux. Dans ce contexte, nous avons pu constater que l'activité des animaux obèses (DIO et ob/ob) (respectivement 371 ± 220 et 232 ± 88 déplacements) était significativement diminuée par rapport à celle des animaux témoins (1312 ± 168) ($p < 0.05$) (figure 3.2.), conformément à ce que nous avons déjà eu l'occasion d'observer lors de la manipulation des animaux et leur observation à l'animalerie. Cependant, dans les tests d'exploration non opérante ou dans une tâche opérante de discrimination olfactive, nous n'avons observé aucun problème pour les souris obèses concernant leur vitesse de déplacement pour explorer les cônes plastiques en comportement spontané ou pour aller du port à odeur au port à récompense dans le temps imparti dans la tâche de discrimination olfactive opérante.

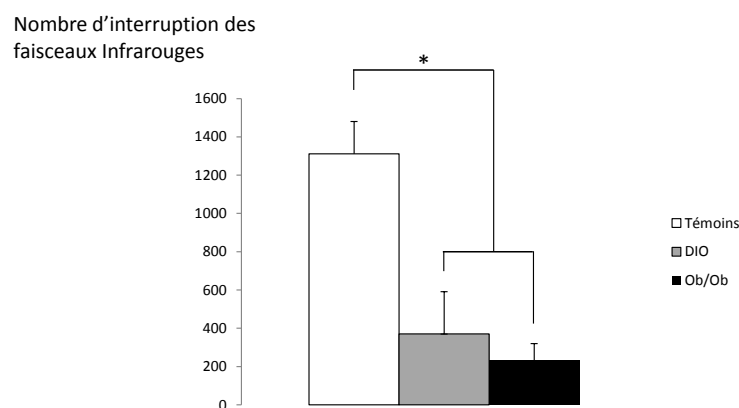


Figure 3.2 Déplacements comptabilisés sur un cycle de 24h chez des souris nourries. L'activité globale de chaque souris est estimée par rapport à ses déplacements dans la cage de l'actimètre, grâce à des capteurs infrarouges, pendant une durée de 24h. Chaque déplacement dans une des neuf parties de la cage incrémente le compteur de déplacement d'une unité. Il ne s'agit pas d'une mesure de la distance parcourue, mais plutôt de la mobilité générale de chaque animal au cours de 24h.

3. Imagerie Optique des Signaux Intrinsèques

Nous avons procédé au protocole d'IOSI chez les souris témoins et les souris ob/ob. Les cartes induites par présentation de l'odeur alimentaire (butyraldéhyde) et neutre (hexanal), deux molécules de la famille des aldéhydes qui ont une odeur fruitée, activent la partie antérieure du BO chez les deux groupes de souris. Nous avons observé par cartographie optique sensible aux variations d'oxygénation vasculaire que les zones activées chez les souris obèses en réponse aux deux odeurs sont plus larges que chez les souris témoins (figure 3.3.A): Remarquez les zones sombres correspondant aux régions activées absorbant les photons dans le rouge, et l'extension de l'activation vers les régions postérieures chez la souris obèse. Chaque odeur, bien qu'activant la même zone sur la surface du BO, possède une carte glomérulaire spécifique. Notez une plus large surface d'activation chez la souris obèse comparée à la souris contrôle (figure 3.3B). Le décours temporel ou l'amplitude du maximum d'absorption dans les régions d'intérêt sont quant à eux identiques (figure 3.3.C. et D): les valeurs de variation de réflectance sont de -4.04% et -3.68% pour les ob/ob versus -4.11% et -4.14% pour les C57BL6 respectivement pour l'odeur d'hexanal et de butyraldéhyde. Cependant, étant donné le faible nombre de souris (n=2) que nous avons pu tester à cause des problèmes d'anesthésie spécifique aux souris obèses, nous avons obtenu un nombre réduit de souris imagées et nous avons dû abandonner cette approche au profit du MEMRI. De fait, nous n'avons pas essayé d'enregistrer les DIO en imagerie optique.

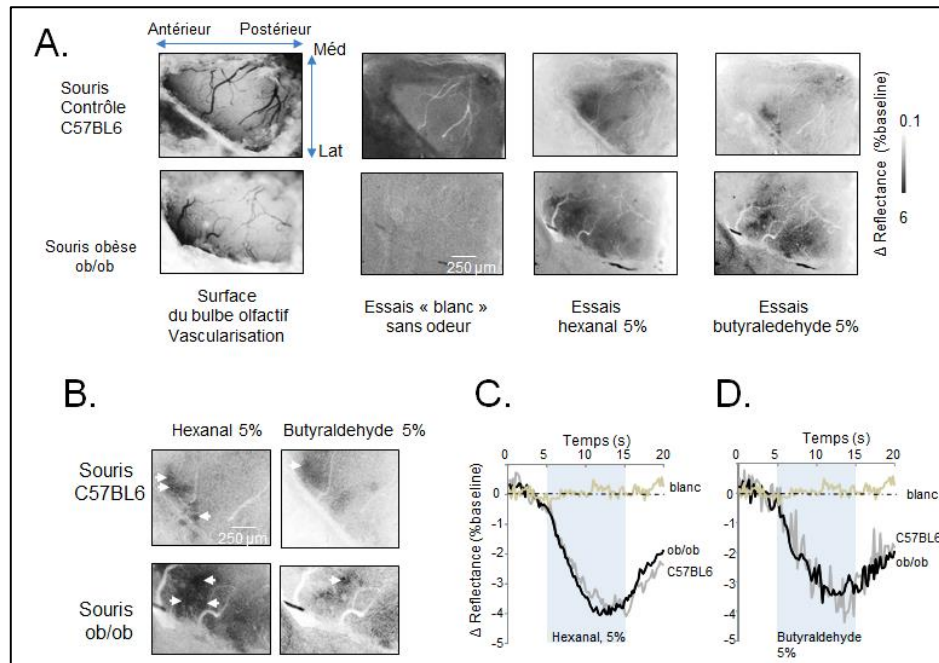


Figure 3.3. Imagerie optique de l'activation glomérulaire du BO. A. Cartes olfactives brutes chez une souris C57BL6 versus une ob/ob. De gauche à droite, première colonne, image de la vascularisation de la partie dorsale du BO acquise sous lumière verte (540 nm) ; deuxième colonne, image moyenne de 6 essais « blanc » où seul l'air est présenté à la souris acquise sous lumière rouge (630 nm). Remarquez l'absence de signal d'absorption ; troisième colonne, image moyenne de 6 essais de stimulation sous hexanal 5% et de butyraldéhyde 5%. B. Zoom sur la région antéro-médiane. Chaque odeur, bien qu'activant la même zone sur la surface du BO, possède une carte glomérulaire spécifique. Notez une plus large surface d'activation chez la souris obèse comparée à la souris contrôle. C. D. Décours temporel moyen du signal optique dans les régions d'intérêt indiquée par des flèches blanches sur la carte olfactive de la souris C57BL6 versus ob/ob, respectivement pour l'odeur d'hexanal et de butyraldéhyde : remarquez l'absence de différence de décours ou de maximum d'amplitude entre les deux souches (n=2 pour chaque groupe).

4. Tests comportementaux d'exploration olfactive spontanée

Pour nous assurer que les souris avaient une préférence d'exploration envers l'odeur associée à la nourriture palatable (par rapport à une odeur déjà rencontrée mais non associée à la nourriture), c'est-à-dire qu'elles avaient mémorisé cette odeur comme étant une odeur alimentaire, nous avons effectué plusieurs tests comportementaux d'exploration spontanée effectués par Laurène Abjean (stagiaire de M1) et Hirac Gurden. Ce sont les mêmes souris qui ont fait les différents tests d'exploration spontanée pour chaque groupe ob/ob, témoins ob, DIO, témoins DIO.

4.1 Exploration de l'odeur d'amande, de l'odeur d'orange et de l'odeur de pentylacétate

Au cours de cette expérience, nous nous sommes assuré que les animaux développaient une préférence à l'odeur associée à la récompense alimentaire (ici, l'odeur d'amande) en comparant les temps d'exploration de cônes contenant un papier filtre imbibé avec différentes odeurs contre un cône contenant un papier filtre imbibé avec de l'huile minérale avec laquelle nous avons dilué les odeurs. Notre hypothèse de base est qu'à l'état nourri le temps d'exploration est faible pour toutes les odeurs et qu'à jeun, ce temps augmente fortement (Prud'Homme et al., 2009). Nous avons d'abord exposé les animaux à l'odeur d'amande, une odeur alimentaire qui est susceptible d'augmenter leur temps d'exploration à jeun. Ensuite, nous avons testé une odeur d'orange à laquelle les animaux ont été régulièrement exposés avant l'expérience, mais qui n'était pas associée à un aliment. Dans cette condition, nous avons émis l'hypothèse qu'à jeun les souris habituées à cette odeur ne l'exploreraient pas très longtemps. Enfin, nous avons testé une odeur de pentyl acétate, une odeur nouvelle jamais rencontrée par les animaux auparavant, qui, de par sa nouveauté, aurait pu intéresser les animaux et entraîner un temps d'exploration long.

• Souris ob/ob et leurs témoins

Pour l'exploration de l'odeur d'amande placée sur un filtre de café dans un cône, les souris ob/ob nourries ($n=5$) l'explorent pendant 6.6 ± 2.2 s contre 4.0 ± 0.7 ($n=7$) pour les témoins. A jeun les souris témoins explorent le tube d'amande pendant 10.3 ± 2.3 s. L'analyse statistique n'indique pas de différence intragroupe pour les ob/ob ou les témoins mais une augmentation à jeun intragroupe pour les témoins (test de Wilcoxon, $p=0.04$) (figure 3.5.).

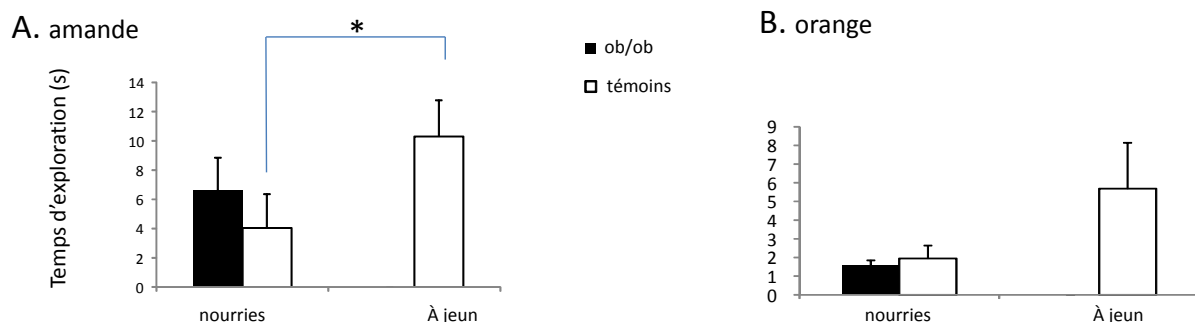


Figure 3.4. Test d'exploration de l'odeur d'amande associée à la nourriture (A) et odeur d'orange connue mais non associée à de la nourriture (B) chez les souris ob/ob et témoins nourries et témoins à jeun. Notez, chez les témoins, la sensibilité de l'exploration de l'odeur associée à la nourriture à jeun mais son absence pour l'odeur non associée. Temps total d'exploration 3 minutes.

Pour l'odeur d'orange qui est une odeur à laquelle les souris ont été habituées sans association à la nourriture, les résultats d'exploration indiquent à l'état nourri pour les ob/ob $1.6 \pm 0.2s$ (n=5) contre $1.9 \pm 0.5s$ aux témoins (n=7) (test de Mann-Whitney, $p=0.1$, non significatif). A jeun, les témoins explorent le tube pendant $5.7 \pm 2.0s$ (n=7), ce qui n'est pas significativement différent du temps d'exploration à l'état nourri, malgré une tendance à la hausse (test de Wilcoxon, $p=0.06$, non significatif).

Pour l'odeur de pentyl acétate, odeur nouvelle que les souris n'ont jamais rencontrée auparavant, les résultats d'exploration indiquent à l'état nourri pour les ob/ob $5.4 \pm 0.8s$ (n=4) contre $5.0 \pm 1.16s$ aux témoins (n=4) (test de Mann-Whitney, $p=0.4$, non significatif). A jeun, les témoins explorent le tube pendant $4.3 \pm 1.3s$ (n=4), ce qui n'est pas significativement différent du temps d'exploration à l'état nourri (test de Wilcoxon, $p=0.2$, non significatif).

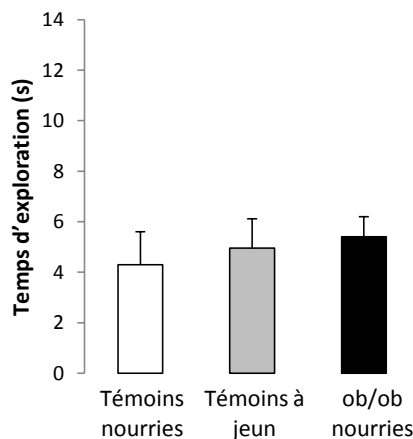


Figure 3.5. Test d'exploration de l'odeur de pentyl acétate, odeur nouvelle jamais rencontrée, chez les souris témoins nourries et à jeun et chez les souris ob/ob nourries. Temps total d'exploration 3 minutes.

Ces résultats indiquent que les odeurs non-associées à de la nourriture sont beaucoup moins attractives pour les souris : i) les ob/ob et les témoins nourries semblent passer moins de temps à explorer l'orange et le pentylacétate que l'amande, mais ceci reste à vérifier en comparant directement les deux odeurs à l'aide d'une expérience dédiée ii) même les souris témoins à jeun passent moins de temps à explorer l'odeur d'amande que l'odeur d'orange ou l'odeur de pentyl acétate (comparaison figure 3.6.A versus 3.6.B et 3.6.A versus 3.7). Chez les témoins, la faim semble donc favoriser uniquement l'exploration de l'odeur alimentaire. Il est difficile de tirer des conclusions à propos des souris ob/ob, puisqu'à jeun, elles demeuraient toutes immobiles. Le jeun semble donc avoir un fort impact comportemental sur les souris ob/ob et sur leur motivation/capacité à explorer leur environnement olfactif.

• Souris DIO

Les DIO nourries explorent le tube d'amande pendant 3.0 ± 0.8 s (n=5) contre 4.0 ± 1.4 s pour les témoins. Les DIO à jeun (n=7) passent 10.8 ± 3.6 s à explorer le cône cible contre 25.1 ± 5.6 s pour les témoins (n=3). Les trois souris témoins DIO à jeun mordent le cône contenant le filtre imbibé de l'odeur d'amande. Il existe une différence statistique entre l'état nourri et à jeun pour les DIO (test de Wilcoxon, $p=0.04$) mais pas de différence intragroupe pour les témoins (Wilcoxon, $p=0.10$) ni entre DIO et témoins (test de Mann Whitney, $U=16$; $p=0.07$).

Pour l'odeur d'orange, les DIO passent 5.1 ± 1.2 s (n=5) à l'état nourri contre 5.16 ± 1.4 s à jeun. Pour les souris DIO témoins, il y eu le décès de l'une des 3 souris. Avec deux souris, il est impossible d'effectuer les tests statistiques. A titre indicatif, les moyennes de ces deux souris étaient de 1.9s pour l'exploration du cône odorisé à l'orange à l'état nourri contre 5.7s à jeun. Contrairement à l'odeur d'amande, cette odeur d'orange connue mais non associée à la nourriture, semble beaucoup moins attractive pour les souris DIO (comparaison figure 3.7.A versus 3.7.B.).

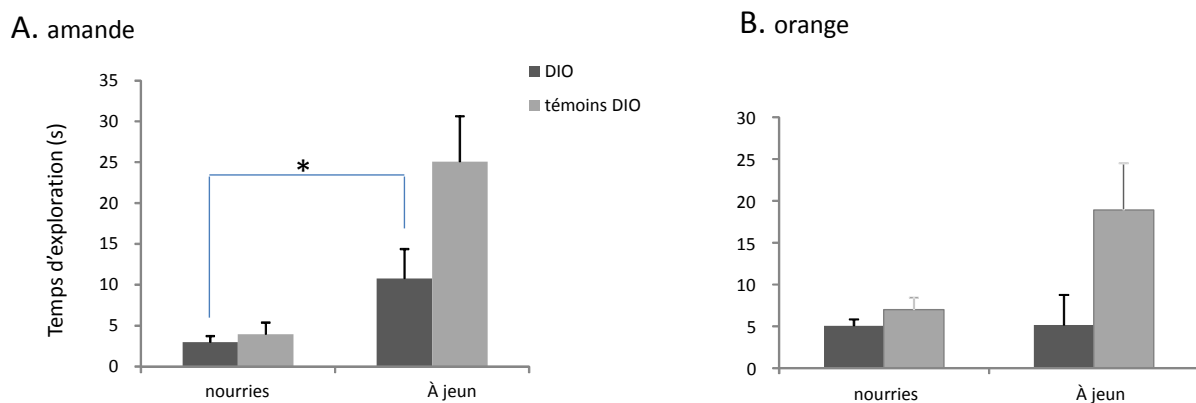


Figure 3.6. Test d'exploration de l'odeur d'amande associée à la nourriture (A) et odeur d'orange connue mais non associée à de la nourriture (B) chez les souris DIO et témoins à jeun. A. Notez la tendance à l'augmentation de l'exploration de l'odeur d'amande par les souris témoins DIO mais sans que le test soit statistiquement significatif pour cause d'échantillon faible (n=3) et de stringence élevée du test non paramétrique. temps total d'exploration 3 minutes. B. Les souris DIO n'explorent pas davantage l'odeur d'orange à jeun, contrairement à leur comportement face à l'odeur d'amande (figure 3.5.B).

Il est important de noter que dans tous ces tests d'exploration spontanée, nous avons systématiquement relevé l'identité du premier cône exploré par la souris pour savoir s'il influençait les temps d'exploration, surtout pour le test avec la pâte odorisée, et nous n'avons pas trouvé de lien.

Face au problème des souris ob/ob qui restent immobiles à jeun, nous avons essayé de tester leur préférence olfactive d'une manière différente en nous focalisant sur la pâte sucrée et en la présentant odorisée à l'amande ou non odorisée.

4.2 Exploration de la pâte odorisée versus la pâte non odorisée.

Dans ce test, nous nous sommes assuré que les souris se dirigeaient préférentiellement vers la nourriture palatable de pâte sucrée grâce aux indices olfactifs associé à l'odeur d'amande, et non pas des indices visuels ou par rapport à « une odeur sucrée », qui potentiellement serait contenue dans les deux pâtes. Nous avons aussi exploré si cette préférence d'exploration était supérieure chez les ob/ob. Pour cela, nous avons compté le temps passé à explorer un cône contenant la pâte odorisée contre un cône contenant la même pâte sans odeur.

• Souris ob/ob

A l'état nourri, où seul le manque de leptine différencie les deux groupes, les ob (n=5) passent 4.8 ± 0.9 s à explorer la pâte odorisée contre 2.7 ± 0.4 s sur la pâte non odorisée durant les trois minutes passées dans la cage test. Les témoins (n=7) passent 1.7 ± 0.7 s sur le cône odorisé versus 2.2 ± 0.5 s sur le cône non odorisé (figure 3.4.A). A jeun, (réduction des taux circulants de leptine et d'insuline), les mêmes souris témoins passent 15.7 ± 2.4 s sur le cône cible contre 16 ± 3.3 s pour le cône avec la pâte sans odeur (figure 3.4.A). Les souris ob/ob mises à jeun 17h sont totalement immobiles et leur temps d'exploration ne peut être compté. Les statistiques nous indiquent une différence intragroupe pour les ob/ob (test de Wilcoxon apparié, $p=0.04$) mais pas pour les témoins ($p=0.34$). Elles indiquent également une différence intergroupe d'exploration pour le tube contenant la pâte odorisée (test de Mann Withney, $U=8$, $p<0.001$). De façon surprenante, à jeun, les souris témoins explorent davantage les deux pâtes, odorisées ou non, alors qu'on aurait pu s'attendre à une préférence pour la pâte odorisée.

Ces résultats indiquent qu'à l'état nourri, les ob/ob développent une préférence envers l'odeur d'amande et ont une exploration plus longue de la pâte odorisée par rapport à des souris témoins (aux taux de leptine endogènes élevés) qui passent un temps d'exploration équivalent entre les deux pâtes. Nous pouvons proposer une hypothèse pour expliquer ce résultat : les animaux témoins ont développé une préférence non seulement à l'odeur d'amande mais également à l'odeur de farine, et explorent les deux pâtes de manière équivalente. Cependant, elles développent bien une préférence pour l'odeur d'amande, lorsque celle-ci n'est pas associée à la pâte de farine, comme indiqué dans la partie 4.2, figure 3.6.A. Le jeûne induit une augmentation du temps d'exploration globale des souris témoins pour les deux tubes, sans spécificité par rapport à la pâte d'amande. Pour les souris nourries, nous avons répliqué ce test : 9 ob/ob ont passé en moyenne 4.7 ± 0.5 s sur le cône contenant la pâte odorisée contre 1.7 ± 0.5 s pour le cône contenant la pâte non odorisée. Les 12 souris témoins passent respectivement 2.2 ± 0.3 s et 2.4 ± 0.4 s pour l'exploration de la pâte odorisée versus non odorisée. Les

données statistiques sont similaires à celles obtenues pour le premier lot. A remarquer qu'une souris témoin à jeun de chaque groupe (initial et dupliqué) a été exclu puisqu'elles avaient un comportement hyperactif, comme prises de panique si nous pouvons le qualifier ainsi, sans aucune attention aux cônes, avec une exploration frénétique de la cage.

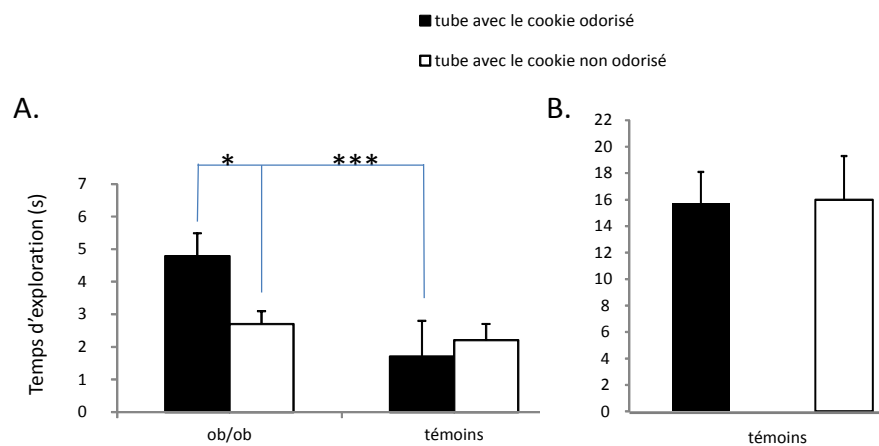


Figure 3.7. Test d'exploration de la pâte odorisée versus non odorisée chez les souris ob/ob et témoins. A. Souris nourries B. Souris témoins à jeun, les souris ob/ob à jeun sont totalement immobiles. Notez la différence d'échelle de temps entre souris nourries et à jeun. Temps total d'exploration de 3 minutes.

• Souris DIO

A l'état nourri, durant les trois minutes passées dans la cage test, les DIO (n=6) passent 3.3 ± 0.7 s à explorer la pâte odorisée contre 1.6 ± 0.5 s sur la pâte non odorisée. Les témoins (n=5) passent 4.9 ± 1.1 s sur le tube odorisé versus 4.1 ± 1.6 s sur le tube non odorisé (figure 3.5). Il existe une différence intragroupe pour les DIO en faveur de la pâte odorisée (test de Wilcoxon apparié, $p=0.04$) mais pas pour les témoins DIO. En comparaison intergroupe, nous n'avons pas détecté de différence dans l'exploration du cône avec la pâte odorisée ($U=25$, $p=0.15$). Ces résultats indiquent que les DIO nourries (qui n'ont pas des taux de leptine aussi réduits que chez les ob/ob) ne passent pas plus de temps que les témoins à explorer la pâte odorisée. A jeun, les mêmes souris DIO passent 13.9 ± 1.9 s sur le cône cible contre 10.5 ± 1.7 s sur le cône contenant la pâte non odorisée. Les souris témoins passent 17.9 ± 2.9 s sur le cône cible contre 14.9 ± 1.3 s sur le cône contenant la pâte non odorisée. A jeun, les souris DIO et leurs témoins présentent une tendance à explorer préférentiellement la pâte odorisée alors qu'on aurait pu s'attendre à une préférence nette pour la pâte odorisée.

Ces résultats indiquent que le jeûne induit une forte augmentation du temps d'exploration globale des DIO par rapport à la pâte sucrée qu'elle soit odorisée ou non et ce comportement est le même chez les témoins DIO. De manière intéressante, lorsque les animaux sont nourris et qu'ils sont en présence d'une pâte sucrée et odorisée et d'une autre non odorisée, seul les animaux obèses (DIO et ob/ob) semblent explorer préférentiellement la pâte sucrée odorisée. Le comportement d'exploration olfactive des animaux obèses (DIO et ob/ob) est donc différent de celui des animaux témoins, et ce quel que soit l'état nutritionnel.

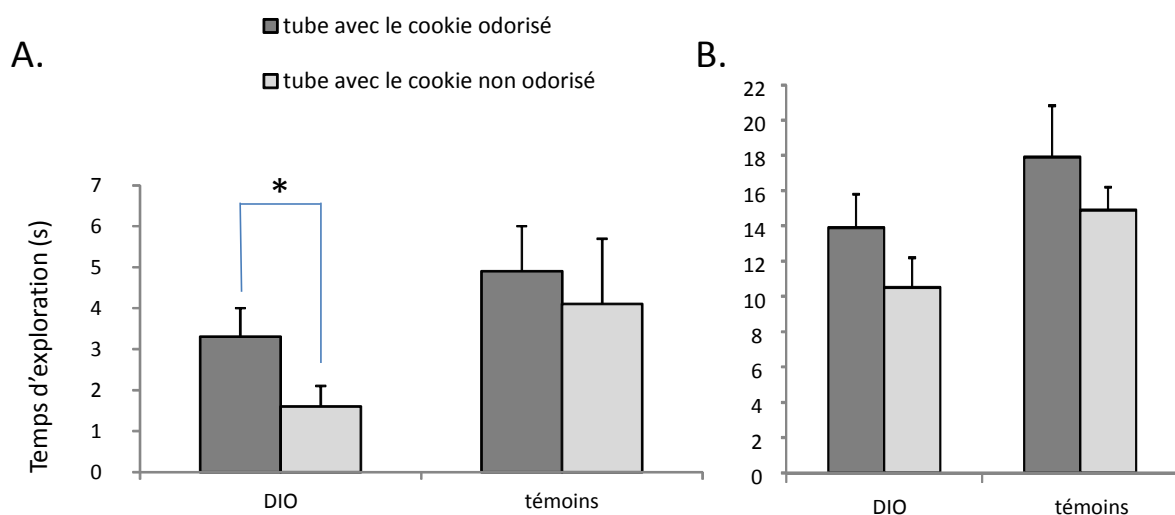


Figure 3.8. Test d'exploration de la pâte odorisée versus non odorisée chez les souris DIO et témoins. A. Souris nourries B. Souris à jeun. Notez la différence d'échelle de temps entre souris nourries et à jeun et la forte augmentation de l'exploration des souris DIO et de leurs témoins à jeun. Temps total d'exploration 3 minutes.

L'ensemble de ces résultats indiquent que le comportement d'exploration olfactive est modulé par l'état nutritionnel de l'animal : les animaux témoins et DIO semblent explorer significativement plus longtemps l'odeur d'amande (précédemment associée à un aliment) quand ils sont à jeun que lorsqu'ils sont nourris. En revanche, à jeun, les animaux ob/ob restent totalement immobiles dans la cage et n'explorent pas du tout leur environnement. Le temps d'exploration de l'odeur d'orange ne semble pas être significativement modulé par l'état nutritionnel, quel que soit le groupe considéré.

Même si l'activité spontanée d'exploration est très hétérogène et dépendante du contexte (le jour, l'état de la souris...), pour résoudre les problèmes rencontrés chez les ob/ob à jeun, nous pouvons proposer de comparer le temps d'exploration de l'amande (alimentaire) versus l'orange (en habituation sans être alimentaire) chez les ob/ob nourries. Nous devrions observer une nette différence

d'exploration en faveur de l'odeur alimentaire et montrer ainsi définitivement l'apprentissage de l'odeur d'amande comme odeur alimentaire.

5. IRM renforcée au contraste de manganèse

5.1 Analyse manuelle de l'intensité brute des pixels

Avant de débiter nos analyses, nous avons acquis en IRM les images du cerveau d'une souris qui n'avait pas reçu d'injection de manganèse, pour vérifier par la suite que le manganèse induisait bien une activation spécifique du BO. Nous n'avons pas noté d'augmentation d'intensité particulière au sein du BO chez cette souris, comme indiqué sur la figure 3.8. L'acquisition a été réalisée strictement dans les mêmes conditions que pour toutes les autres souris.



Figure 3.9 Visualisation du BO de souris témoin par IRM, sans injection de manganèse. L'acquisition a été réalisée avec les mêmes paramètres que pour les autres souris. Les coupes sont montrées de la partie postérieure du BO (A) vers la partie antérieure (C) et sont séparées de 560µm. Notez l'absence de signal de contraste dans le BO.

Nous avons alors procédé au protocole MEMRI chez les souris témoins et les souris ob/ob, en utilisant différentes stimulations olfactives. En plus de fournir un signal neuronal direct, les avantages du MEMRI sont de pouvoir visualiser l'ensemble du BO et d'enregistrer à la fois l'activité spontanée et l'activité induite par stimulation sensorielle. Le MEMRI permet de visualiser l'activité du BO de façon différée, et, à priori, sans tenir compte de l'influence de l'anesthésie, qui affecte de manière prononcée la représentation spatiale des odeurs dans le BO. Pour chaque animal, nous avons obtenu la distribution d'activité nous permettant de définir manuellement les zones d'intérêt à étudier et isoler

les pixels dont l'activité correspond aux cellules du BO activées pour un stimulus donné (cartes représentatives figure 3.9).

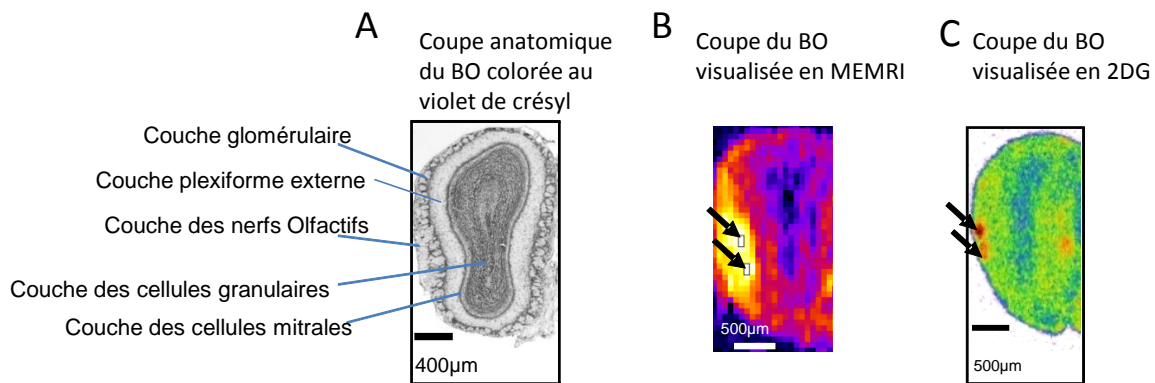


Figure 3.10 : Localisation du signal MEMRI dans le BO. A) Section coronale d'un BO de souris colorée au violet de Crésyl, avec indication des différentes couches cellulaires. B) Visualisation de l'activation de la couche glomérulaire du BO par MEMRI chez une souris c57BL6 stimulée avec une odeur d'amande ayant été associée à de la nourriture. C) Visualisation de l'activation de la couche glomérulaire du BO par 2DG chez une souris c57 ayant été stimulée avec une odeur de benzaldéhyde, un des composants de l'arôme d'amande. Pour B et C : l'intensité de l'activation est représentée en code couleur, les couleurs chaudes indiquent une activation plus forte.

Pour nous assurer que l'absorption et le transport du manganèse s'effectue de manière correcte dans chaque groupe, nous avons évalué la dynamique temporelle du MEMRI en comparant l'accumulation de manganèse au cours du temps (pour des acquisitions à 90, 120, 150 et 180 min postinjection de manganèse) entre des souris témoins ($n=4$) et ob/ob ($n=4$) stimulées uniquement avec de l'air (figure 3.10). L'intensité du signal a été calculée en comparant les valeurs d'intensité maximale brute de chaque image aux valeurs de la zone de référence, qui ici était la joue, une zone dans laquelle la nature des tissus, et de fait l'intensité relevée, ne varie pas sur l'axe rostro-caudal étudié. La vitesse d'accumulation de manganèse observée dans ces groupes semble être en accord avec les données décrites dans la littérature (Gobbo et al., 2012) : de 90 à 150 min, on observe une augmentation de l'intensité brute exprimée en unité arbitraire (u.a.) d'environ 5% (de $4,05 \pm 0,13$ u.a. à $4,23 \pm 0,14$ u.a. chez les animaux témoins et de $4,29 \pm 0,09$ u.a. à $4,49 \pm 0,12$ u.a.). A 90 min, le manganèse arrive au niveau des glomérules, et à 120 min, l'intensité est significativement supérieure dans le groupe ob/ob ($p = 0,018$), mais redevient similaire à celle des témoins par la suite, soulignant une dynamique de transport légèrement différente dans les deux groupes pour des temps d'acquisition précoces. Nous avons de fait choisi d'analyser les images acquises 150 min après l'injection, à un temps où les deux groupes sont dans des conditions similaires et où le transport du manganèse n'affecte pas les comparaisons d'activité du BO entre les groupes obèses et témoins. Il convient de préciser que nous avons également relevé les valeurs d'une zone de référence, placée dans la joue,

pour toutes les souris et à tous les temps d'acquisition pour nous assurer que les conditions d'enregistrement étaient similaires et que le signal radiofréquence d'émission ne variait pas d'une souris à l'autre : la valeur d'intensité brute de cette région de $0,55 \pm 0,04$ u.a. pour les ob/ob (n=4) et de $0,55 \pm 0,05$ u.a. pour les témoins (n=4) est identique sur les 7 tranches analysées aux 4 temps d'enregistrement (soit 28 valeurs par souris) entre les groupes. Pour cette raison, nous avons par la suite indiqué les valeurs d'intensité radiofréquence brute pour nos images, sans normaliser les valeurs par rapport aux joues des animaux.

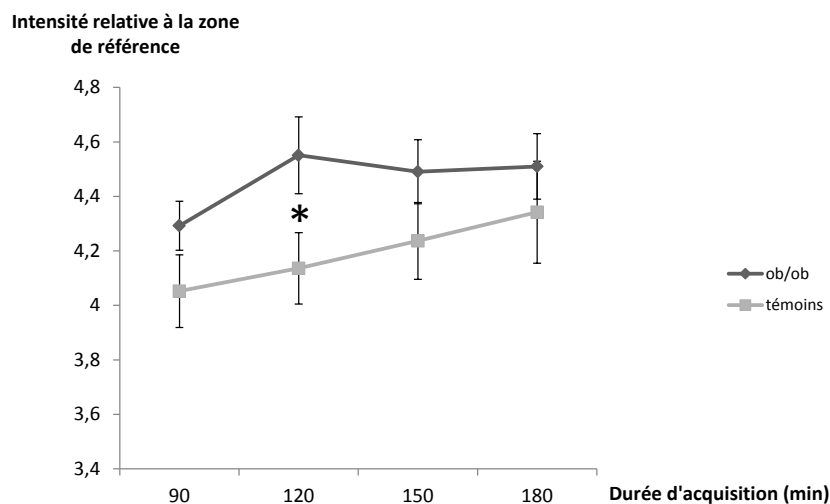


Figure 3.11. : Dynamique temporelle du MEMRI chez des souris stimulées avec de l'air. Les courbes indiquent l'évolution moyenne (moyenne \pm SEM) de l'intensité dans le ROI centré sur la couche glomérulaire, où le signal est le plus fort, relativement à la zone de référence dans la joue au cours du temps. * différence d'intensité significative ($P < 0,05$).

Le comptage de ces pixels nous a donné une bonne indication de l'activité spécifique à un phénotype de souris par rapport au stimulus présenté. Malheureusement, après une étude exhaustive des groupes obèses et témoins qui s'est arrêtée peu avant le jury de mi-thèse, nous nous sommes rendu compte de certaines de ses limites : les images analysées fournissent une information quantitative très fiable sur le nombre de pixels activés, mais l'information qualitative, de la distribution d'activité induite par présentation de l'odeur alimentaire, est difficile à appréhender du fait de la distribution 3D des pixels analysé et choisi manuellement dans des régions d'intérêt (figure 3.11.). En étudiant les images une par une, il était impossible de tirer une conclusion fiable et d'établir l'organisation spatiale des pixels surnuméraires observés chez les ob/ob. Nos résultats significatifs enregistrés pour 5 souris dans chaque groupe (figure 3.12.) indiquent que des animaux témoins stimulés à 5% d'odeur d'amande présentent davantage d'activité que les témoins stimulés avec de l'air (209 pixels contre

107, $n=5$, Mann-Whitney : $P=0.001$) ; que les souris obèses stimulées à 5% d'odeur d'amande ont une activité accrue par rapport aux obèses stimulées avec de l'air (300 pixels contre 126, Mann-Whitney : $P=0.001$) ; que l'on observe autant de pixels activés chez des animaux obèses stimulés avec de l'air par rapport à des animaux témoins stimulés avec de l'air (126 pixels contre 107, Mann-Whitney : $P=0.317$) ; et qu'enfin des animaux obèses stimulés à 5% d'odeur d'amande présentent davantage de pixels actifs détectés que des animaux obèses stimulés à 5% d'odeur d'amande et ayant reçu une injection intra péritonéale de leptine (300 pixels contre 44, Mann-Whitney : $P<0.0001$). Toutes les autres comparaisons ne donnaient pas de résultats significatifs,

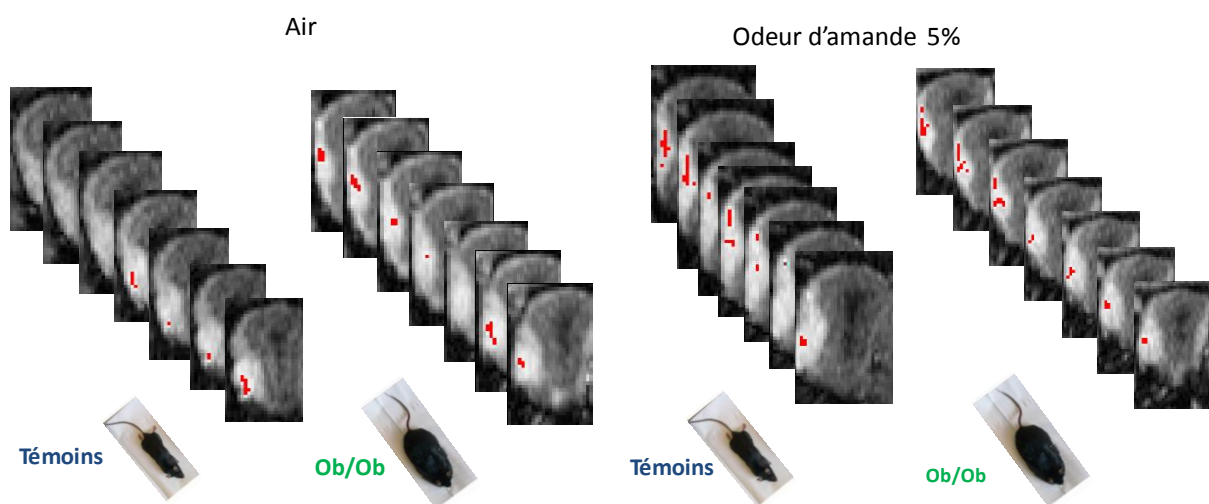


Figure 3.12. Images représentatives de la distribution brute d'activité obtenues par MEMRI (analyse manuelle par Image J). Les points rouges représentent les pixels dont l'intensité est supérieure à un seuil défini par l'expérimentateur et qui indique de façon certaine une activité cellulaire. Qu'on stimule les animaux avec de l'air ou avec une odeur d'amande (5%) précédemment associée à de la nourriture, ce sont les animaux ob/ob qui présentent une plus forte activité, du moins en nombre de pixels activés.

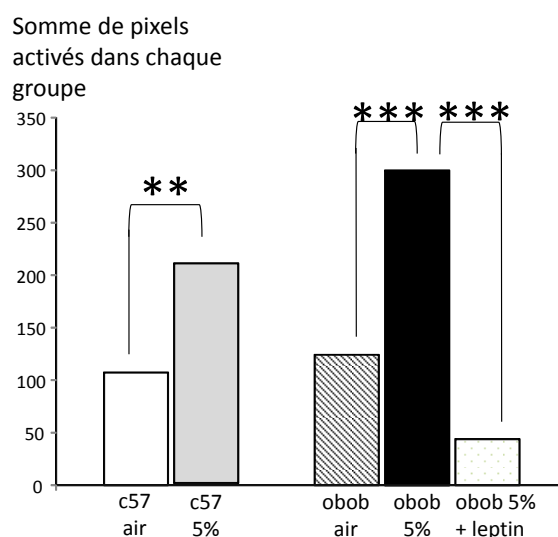


Figure 3.13. : Histogramme indiquant la somme des pixels activés sur l'ensemble des coupes étudiées pour chaque groupe (comptage manuel des pixels dont l'intensité est supérieure à 95% du maximum d'intensité). Commentaires dans le texte du paragraphe précédent cette histogramme.

Dans ce contexte, nous avons développé une autre méthode d'analyse automatisée, indépendante de l'utilisateur, prenant en compte les écarts entre les animaux et ne se limitant pas à une région d'intérêt définie.

5.2. Comparaison d'images MEMRI analysées par SPM

Suite aux divers problèmes rencontrés avec notre méthode d'analyse manuelle des images MEMRI, nous avons mis au point, avec l'appui technique d'Albertine Dubois (IR IMNC), une méthode automatisée, indépendante de l'utilisateur et de tout choix visuel de région d'intérêt. Nous avons choisi de représenter sur une même image, les voxels dont l'intensité est statistiquement différente lors de la comparaison de deux groupes. Il convient de préciser que les images obtenues ne permettent pas de visualiser directement la distribution de l'activation comme pour l'analyse manuelle, mais qu'elles permettent de visualiser les différences significatives d'activité lors de la comparaison des données MEMRI de deux groupes. Chaque image présentée par la suite résulte d'une moyenne et d'un alignement de toutes les images des deux groupes à comparer (pour plus de détails, se reporter au chapitre précédent sur la méthodologie). Pour des raisons de clarté, nous présenterons les résultats de la manière suivante : chaque test mentionne les 2 groupes dont l'activité est comparée. Dans tous les tests, les images indiquent toujours les voxels dont la valeur est significativement supérieure dans le premier groupe cité. Tous les tests ont été réalisés dans les deux sens : dans la

plupart des cas, seulement l'un des groupes présente des zones dont l'activité est supérieure à celle du second. Dans le cas contraire, nous présenterons la comparaison dans les deux sens, en indiquant test « X » et test « X inversé ». Il est important de comprendre l'importance du test inverse : Le test « X inverse » est en quelque sorte l'image miroir du test « X » et nous pouvons lire le test « X inverse » comme présentant les zones moins activées et non visualisées dans le test « X ».

Nous avons étudié l'ensemble du BO (40 coupes), mais toujours pour des raisons de clarté, nous avons choisi de représenter uniquement 6 coupes coronales, de la plus postérieure vers la plus antérieure, avec un espacement de 320µm entre chaque. Nous nous sommes référés à différentes coupes histologiques et à l'atlas anatomique du cerveau de souris en ligne (<http://atlas.brain-map.org>) pour identifier les différentes couches cellulaires du BO, puisque l'atlas de Paxinos présente le BO de façon très limitée.

L'analyse voxel à voxel par comparaison statistique de groupes ne permet que des comparaisons entre 2 groupes et non pas entre groupes multiples donc la lecture des comparaisons ne doit pas se faire en croisant les analyses réalisées avec SPM, ce qui n'aurait pas de sens statistique. Autrement dit si le groupe A est différent du groupe B après analyse par SPM pour une série de régions données, et si le groupe B est différent du groupe C pour une autre série de régions données, qui, à vue d'œil, est partiellement recouvrant avec la comparaison A-B, aucune conclusion ne peut être tirée de la comparaison entre A et C sans faire le test approprié à l'aide du logiciel SPM.

Un tableau de synthèse représentant une image SPM type pour chaque comparaison est présentée en fin de paragraphe, après toutes les comparaisons intergroupes.

5.2.1 Comparaison intra-groupe chez les animaux témoins entre stimulation à l'amande alimentaire 5% et l'air

Le premier test consistait à comparer l'activité des souris témoins stimulées avec une odeur d'amande à 5% avec celle des animaux témoins ayant été stimulés avec de l'air. Cette comparaison permet de localiser l'activation odorante chez les animaux témoins, et nous a permis de valider notre technique en nous permettant de confirmer que l'activation spatiale induite par l'amande chez les témoins est similaire à ce que nous avons pu observer précédemment au laboratoire avec différentes techniques d'imagerie, comme l'autoradiographie au 2-deoxyglucose (Martin et al., 2012) et le MEMRI (Gobbo et al., 2012). Il apparaît que l'odeur d'amande active la GL ventrolatérale de l'hémibulbe droit, principalement dans la partie postérieure du BO, même si une faible activité est présente également dans la partie antérieure (figure 3.13.A). L'intensité moyenne des voxels de la zone mise en évidence chez les animaux témoins stimulés à 5% ($13,20 \pm 0,072$ unités arbitraires (u.a.)) est significativement supérieure à celle des animaux témoins stimulés avec de l'air ($9,42 \pm 0,110$ u.a.)

(t-test = 0.018) (figure 3.13.B) Effectué dans l'autre sens, le test n'indique pas de zone d'activité supérieure chez les animaux témoins stimulés avec de l'air par rapport aux animaux stimulés avec de l'amande à 5% (test 1 inverse).

L'odeur d'amande induit donc efficacement une activité dans la GL du BO. Par ailleurs, la zone d'activation observée correspond bien à ce qui a été observée précédemment au laboratoire à l'aide d'autres techniques d'imagerie (figure 3.9).

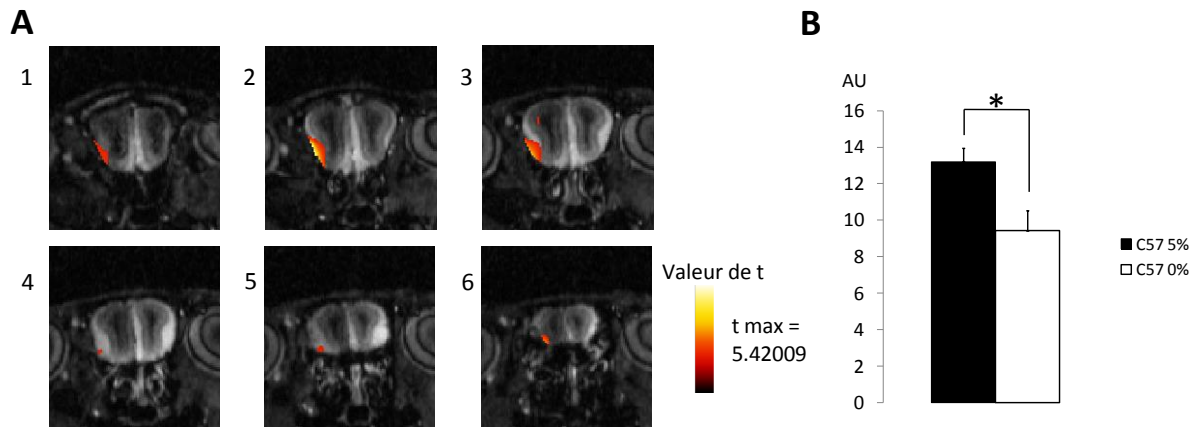


Figure 3.14 Test 1. Comparaison intragroupe de l'activité entre souris témoins stimulées avec 5% d'amande contre des souris témoins stimulées avec de l'air. Les images sont notées de 1 à 6 et représentées de la partie postérieure vers la partie antérieure avec une distance de 4 images soit 320µm entre chaque image. Valeur du t-test= 0.018. AU : arbitrary unit ou unité arbitraire.

5.2.2 Comparaisons inter-groupes pour la stimulation avec de l'air et de l'odeur d'amande alimentaire 5%

Ce test permet de mettre en évidence une éventuelle différence dans l'activité spontanée entre souris témoins et souris obèses : même sans stimulation odorante, les OSN sont des mécanorécepteurs sensibles aux variations de pression de l'air (Grosmaître et al., 2007), présentent une activité spontanée qui plus est sensible à la leptine et l'insuline (Savigner et al., 2009), et peuvent de fait influencer la quantité de manganèse accumulée dans le BO. Toutefois, il ne semble pas y avoir de différence d'activité spontanée entre les deux groupes d'animaux (figure 3.14 A). Une région dorsale restreinte semble être plus activée chez les animaux obèses, mais de façon discontinue sur l'axe rostro-caudal étudié. Ce motif d'activité discontinue très restreint spatialement ne permet pas de calculer et de comparer l'intensité moyenne des voxels de la zone mise en évidence, et ne reflète pas de différence fonctionnelle entre les deux groupes d'animaux. Effectué dans l'autre sens, le test n'indique

pas de zone d'activité supérieure chez les animaux témoins stimulés avec de l'air par rapport aux obèses (test 2 inverse).

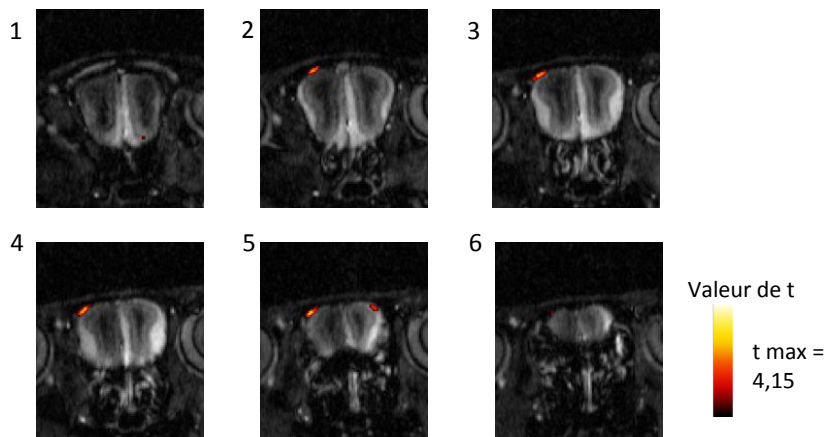


Figure 3.15 Test 2. Comparaison intergroupe de l'activité entre souris ob/ob stimulées avec de l'air contre des souris témoins stimulées avec de l'air. Valeur du t-test= 0.010.

Le deuxième test intergroupe a permis de comparer l'activité induite par l'odeur d'amande à 5%. Chez les animaux obèses stimulés avec cette odeur, la partie postérieure du BO est plus activée au niveau ventromédial de l'hémibulbe droit, et plus particulièrement au niveau de l'ONL et de la GL, mais aussi au niveau d'une partie de la MCL et de la GCL. Au niveau de la partie antérieure du BO, on observe une activité latérale, puis latéro-dorsale, restreinte à des couches cellulaires plus superficielles (MCL et GL) (figure 3.15.A) L'intensité moyenne des voxels de la zone mise en évidence chez les animaux ob/ob stimulés à l'amande ($10,60 \pm 0,056$ u.a.) est significativement supérieure à celle des animaux témoins stimulés ($7,47 \pm 0,022$ u.a.) (t-test= 0.00045) (figure 3.15.B). Effectué dans l'autre sens, c'est-à-dire en cherchant des voxels dont l'intensité est supérieure chez les souris témoins par rapport aux souris obèses, le test n'indique pas de zone d'activité supérieure chez les témoins (test 3 inverse).

Il apparaît de fait que l'activité olfactive est différente chez les animaux obèses : les couches superficielles du BO sont spontanément suractivées, et ce même en l'absence d'une quelconque stimulation olfactive. Par ailleurs, la réponse évoquée par une odeur d'amande qui a été précédemment associée à de la nourriture est non seulement plus puissante, mais active également des zones plus larges, ce qui correspond aux observations obtenues lors de l'analyse manuelle des images MEMRI.

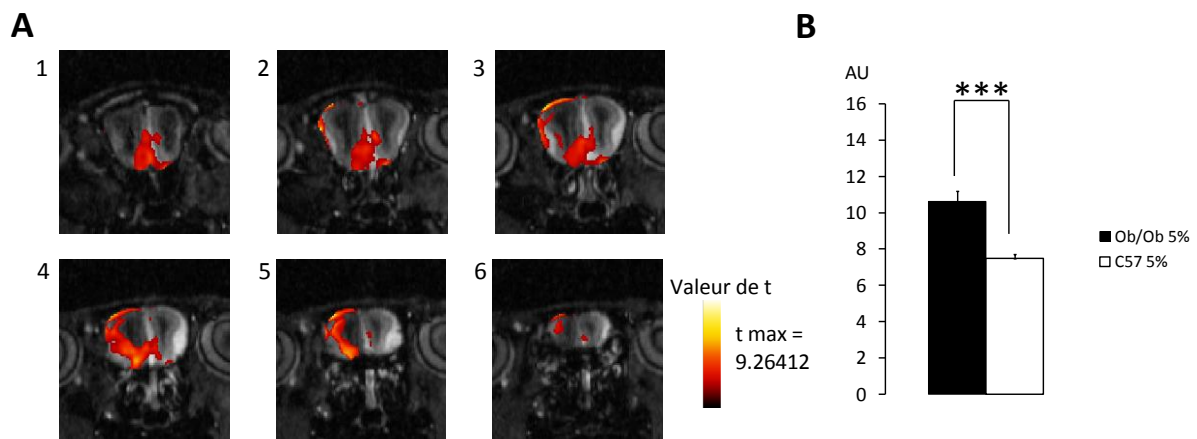


Figure 3.16 Test 3. Comparaison intergroupe de l'activité entre souris ob/ob stimulées avec de l'amande à 5% contre des souris témoins stimulées avec de l'amande à 5%. Valeur du t-test= 0.00045.

5.2.3 Comparaison intra-groupe chez les animaux obèses entre stimulation à l'amande alimentaire 5% et l'air

Ce test compare l'activité des souris ob/ob stimulées avec de l'odeur d'amande à 5% à celle de souris ob/ob stimulées avec de l'air. Par rapport à des ob/ob stimulés avec de l'air, et de façon similaire à ce qui est observé chez des animaux témoins dans le test 1, il apparaît que l'odeur d'amande active notamment la GL ventrolatérale de l'hémibulbe droit. Toutefois, cette activité ne se limite pas au BO postérieur et est importante sur tout l'axe rostrocaudal chez les animaux ob/ob stimulés avec l'odeur d'amande. Chez ces derniers, il existe également une plus forte activité au niveau de la GL ventromédiale ainsi qu'au niveau de la GL dorsale droite antérieure (figure 3.16 A). L'intensité moyenne des voxels de la zone mise en évidence chez les animaux ob/ob stimulés avec de l'odeur d'amande à 5% ($10,98 \pm 0,54$ u.a.) est significativement supérieure à celle des animaux témoins stimulés avec de l'air ($7,45 \pm 1,62$ u.a.) (t-test= 0.003) (figure 3.16.B.). Effectué dans l'autre sens, le test n'indique pas de zone d'activité supérieure chez les animaux stimulés avec de l'air par rapport à ceux stimulés avec de l'amande (test 4 inverse).

Ainsi, la présentation d'une odeur d'amande chez des animaux obèses semble activer, comme chez les témoins, une zone latérale de la GL spécifique de l'odeur d'amande, mais de manière plus étendue, à la fois sur l'axe rostro-caudal mais également sur la partie dorsale et ventrale de la GL.

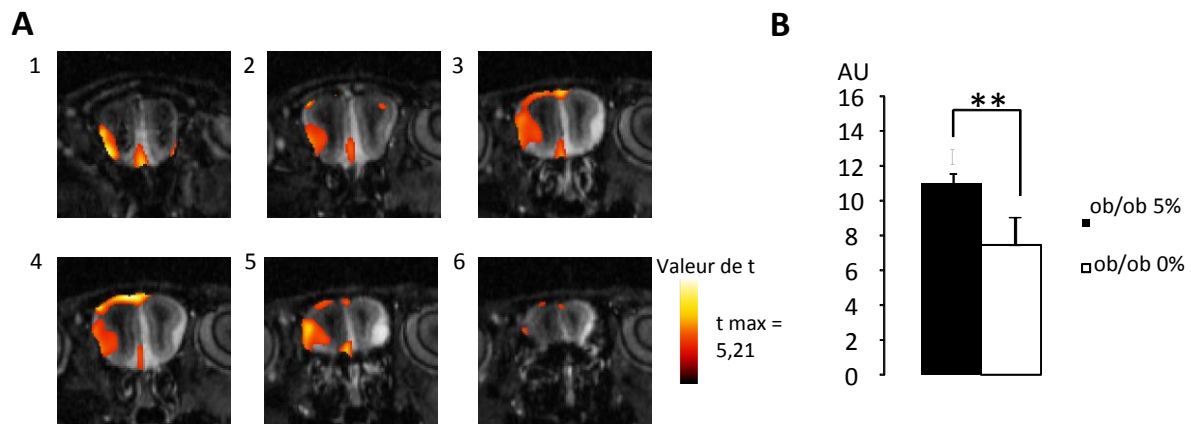


Figure 3.17 Test 4. Comparaison intragroupe de l'activité entre souris ob/ob stimulées avec 5% d'amande contre des ob/ob stimulées avec de l'air. Valeur du t-test= 0.003.

5.2.4 Comparaison intra-groupe : souris obèses stimulées avec de l'air ou de l'odeur d'amande alimentaire versus des souris obèses ayant reçu des injections de leptine

Suite aux tests précédents, un nouveau groupe d'animaux obèses ont reçu des injections de leptine après une stimulation avec de l'air ou une odeur d'amande. Il s'agissait de déterminer si l'injection de leptine pouvait à elle seule modifier l'activité spatiale spontanée ou évoquée par l'odeur alimentaire dans le BO. Le cas échéant, la leptine était-elle capable de restaurer chez les ob/ob l'activité spatiale similaire à celle des témoins?

Nous avons commencé par comparer l'activité des souris ob/ob stimulées avec de l'air et ayant reçu une injection intra péritonéale de leptine à celle de souris ob/ob ayant été uniquement stimulées avec de l'air. L'injection de leptine semble provoquer une augmentation d'activité bilatérale dans les couches profondes du BO (GCL), mais de façon moins étendue et plus uniforme sur un axe antéro-postérieur, que lorsque les animaux sont stimulés avec une odeur alimentaire (figure 3.17.A). L'intensité moyenne des voxels de la zone mise en évidence chez les animaux ob/ob stimulés avec de l'air et ayant reçu une injection de leptine ($6,50 \pm 0,06$ u.a.) est significativement supérieure à celle des animaux ob/ob stimulés uniquement avec de l'air ($3,87 \pm 0,04$ u.a.) (t-test= 0.004) (figure 3.17.B.).

Effectué dans l'autre sens, le test indique que les animaux obèses stimulés avec de l'air mais n'ayant pas reçu de leptine présentent là aussi une activation bilatérale plus importante des couches superficielles latérales ONL et GL (et quelque peu latéro dorsales) par rapport aux animaux ayant reçu de la leptine (figure 3.18.A.). L'intensité moyenne des voxels de la zone mise en évidence chez les animaux ob/ob stimulés avec de l'air ($12,08 \pm 0,081$ u.a.) est significativement supérieure à celle des animaux témoins stimulés avec de l'air et ayant reçu une injection de leptine ($7,84 \pm 0,067$ u.a.) (t-

test= 0.001) (figure 3.18.B.). Il est important de comprendre l'importance du test inverse : nous pouvons lire le test 5 inverse comme présentant les zones moins activées et non visualisées dans le test 5.

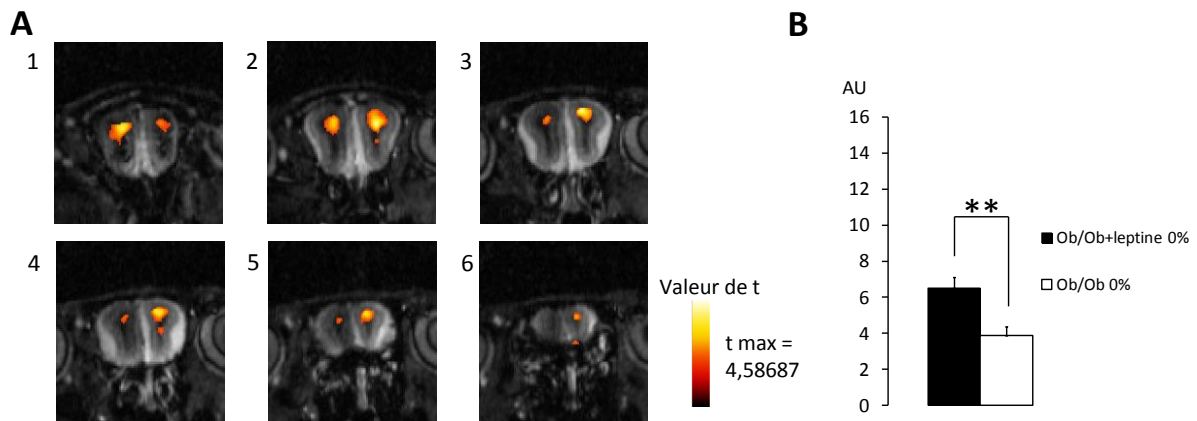


Figure 3.18 Test 5. Comparaison intragroupe de l'activité entre souris ob/ob stimulées avec de l'air et ayant reçu de la leptine contre des souris ob/ob stimulées avec de l'air. t-test= 0.004.

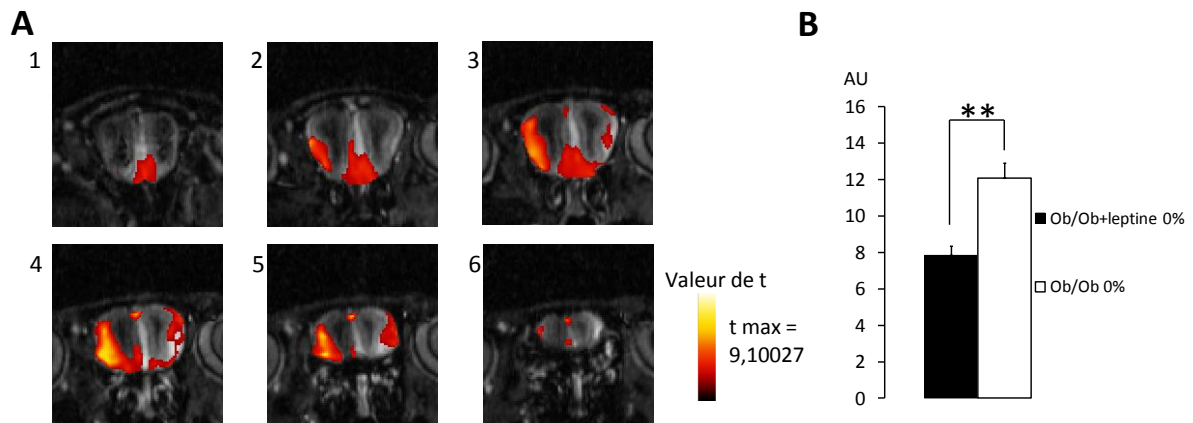


Figure 3.19 : Test 5 inverse. Comparaison intragroupe de l'activité entre souris ob/ob stimulées avec de l'air contre des souris ob/ob stimulées avec de l'air et ayant reçu de la leptine. t-test= 0.001.

Nous avons ensuite comparé l'activité des souris ob/ob stimulées avec de l'odeur d'amande à 5% et ayant reçu une injection intra péritonéale de leptine à celle de souris ob/ob ayant été uniquement stimulées avec de l'amande à 5%. Les deux groupes d'animaux ob/ob ont reçu la même stimulation olfactive. Pourtant, l'injection de leptine semble provoquer une augmentation d'activité bilatérale dans les couches profondes du BO (GCL), mais dont l'étendue diminue néanmoins vers la partie antérieure du BO. Dans le BO postérieur, l'ONL et la GL médiale semblent également être plus actives (figure

3.19.A.). L'intensité moyenne des voxels de la zone mise en évidence chez les animaux ob/ob stimulés avec de l'odeur d'amande à 5% et ayant reçu une injection de leptine ($7,45 \pm 0,06$ u.a.) est significativement supérieure à celle des ob/ob ayant été uniquement stimulées avec de l'amande à 5% ($6,13 \pm 0,021$ u.a.) (t -test= 0.0005) (figure 3.19.B.). Toutefois, effectué dans l'autre sens, le test indique que les animaux obèses stimulés avec 5% d'amande mais n'ayant pas reçu de leptine présentent une activation plus importante des couches superficielles latérales ONL et CG (et quelque peu latéro dorsales) de l'hémibulbe droit par rapport aux animaux ayant reçu de la leptine (figure 3.20.A). L'intensité moyenne des voxels de la zone mise en évidence chez les animaux ob/ob stimulés avec de l'odeur d'amande à 5% ($12,32 \pm 0,04$ u.a.) est significativement supérieure à celle des animaux ob/ob stimulés avec de l'odeur d'amande à 5% et ayant reçu une injection de leptine ($9,45 \pm 0,067$ u.a.) (t -test= 0.003) (figure 3.20.B).

Il semblerait donc que la leptine active les couches profondes du BO et inhibe au contraire les couches superficielles du BO, du moins chez les animaux ob/ob stimulés avec de l'amande à 5%. Ces tests confirment les effets de la leptine observés dans les tests précédents et indiquent que la leptine a une action puissante sur l'activité du BO, action qui n'est que peu influencée par le fait que les animaux aient été stimulés ou non avec une odeur.

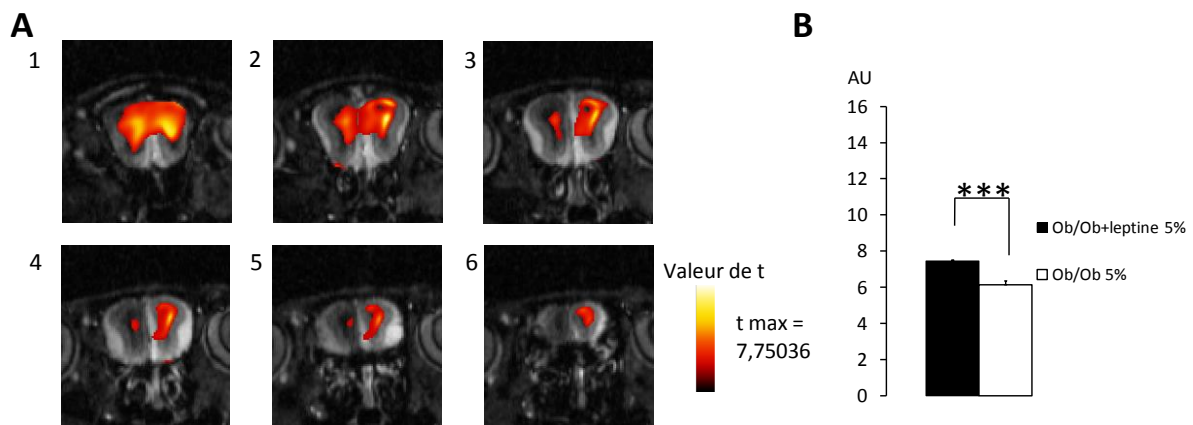


Figure 3. 20 : Test 6. Comparaison intragroupe de l'activité entre souris ob/ob stimulées avec 5% d'amande et ayant reçu de la leptine contre des souris ob/ob stimulées avec 5% d'amande. t -test= 0.0005.

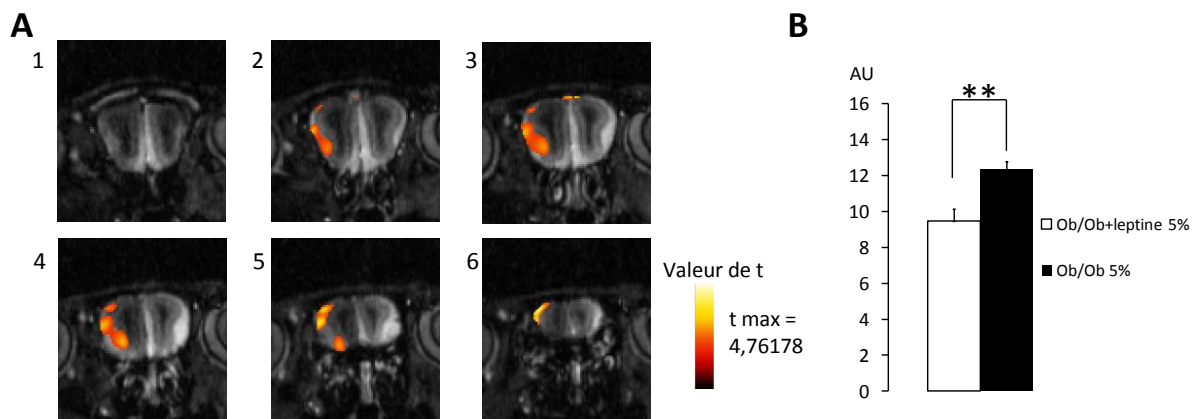


Figure 3.21 Test 6 inverse. Comparaison intragroupe de l'activité entre souris ob/ob stimulées avec 5% d'amande contre des souris ob/ob stimulées avec 5% d'amande et ayant reçu de la leptine. Valeur du t-test= 0.003.

5.2.5 Comparaisons inter-groupes et injections de leptine

Dans ce test, nous avons comparé l'activité des souris ob/ob stimulées avec de l'odeur d'amande à 5% et ayant reçu une injection intra peritonéale de leptine à celle de souris témoins ayant été uniquement stimulées avec de l'amande à 5%. Nous avons réalisé cette expérience pour déterminer si l'injection de leptine chez un animal obèse était susceptible de restaurer une activité du BO similaire à celle d'animaux témoins en réponse à une odeur. Chez les animaux ob/ob, on observe une activité bilatérale plus importante au niveau des couches superficielles dorsales (GL) et ventromediales (ONL et GL), et dans les couches profondes médiales (GCL), et ce de façon assez uniforme sur un axe antéro-postérieur (figure 3.21 A). L'intensité moyenne des voxels de la zone mise en évidence chez les animaux ob/ob stimulés avec de l'odeur d'amande à 5% et ayant reçu une injection de leptine ($8,80 \pm 0,31$ u.a.) est significativement supérieure à celle des témoins ayant été uniquement stimulées avec de l'amande à 5% ($6,58 \pm 0,3$ u.a.) (t-test= 0.0007) (figure 3.21 B).

Il semblerait donc que la différence d'activité entre témoins et ob/ob ne soit pas uniquement due à la leptine, et si l'injection de cette dernière active bien les couches profondes et médiales comme dans les tests 5 et 7, et inhibe la partie latérale comme ce qu'on peut déduire du test 8, son action n'est en revanche pas assez puissante pour inhiber l'activité dans les couches superficielles dorsales et ventrales, qui semblent bien dépendantes de l'odeur d'amande comme dans le test 3, et qui sont supérieures aux couches activées chez les témoins, indépendamment de la leptine. Effectué dans l'autre sens, le test n'indique pas de zone d'activité supérieure chez les animaux témoins stimulés avec de l'amande à 5% (test 7 inverse).

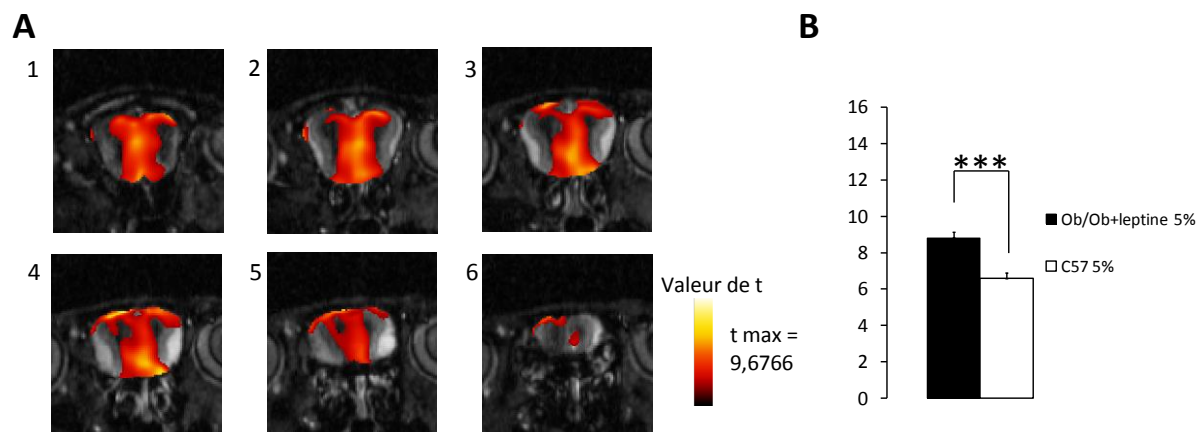


Figure 3.22 Test 7. Comparaison intergroupe de l'activité entre souris ob/ob stimulées avec 5% d'amande et ayant reçu de la leptine contre des souris témoins stimulées avec 5% d'amande. Valeur du t-test= 0.0007.

5.2.6 Comparaison intra-groupe chez les souris témoins stimulées par l'odeur neutre de pentylacétate à 5%

Nous avons voulu vérifier si l'activité olfactive des animaux ob/ob était surexprimée de manière aussi forte lorsque l'odeur utilisée pour la stimulation était neutre, n'avait pas été associée à de la nourriture, et n'avait jamais été rencontrée par la souris auparavant. Pour cela, nous avons choisi une odeur simple bien décrite dans la littérature. Dans ce test, nous comparons l'activité des souris témoins stimulées avec une odeur de pentylacétate à 5% avec celle des animaux témoins ayant été stimulés avec de l'air. Comparé à l'odeur d'amande, le pentylacétate est une odeur pure, qui induit une très forte activation bilatérale dans l'ensemble du BO, quel que soit le groupe étudié (figure 3.22 A). L'intensité moyenne des voxels de la zone mise en évidence chez les animaux témoins stimulés à 5% ($7,87 \pm 0,24$ u.a.) est significativement supérieure à celle des animaux témoins stimulés avec de l'air ($6,21 \pm 0,34$ u.a.) (t-test= 0.0039) (figure 3.22 B). Effectué dans l'autre sens, le test n'indique pas de zone d'activité supérieure chez les animaux témoins stimulés avec de l'air (test 8 inverse). Ces résultats indiquent que le pentylacétate induit une forte activité dans le BO, et que conformément à la littérature, cette activité est différente, notamment en terme de distribution spatiale, par rapport à celle induite par l'odeur d'amande.

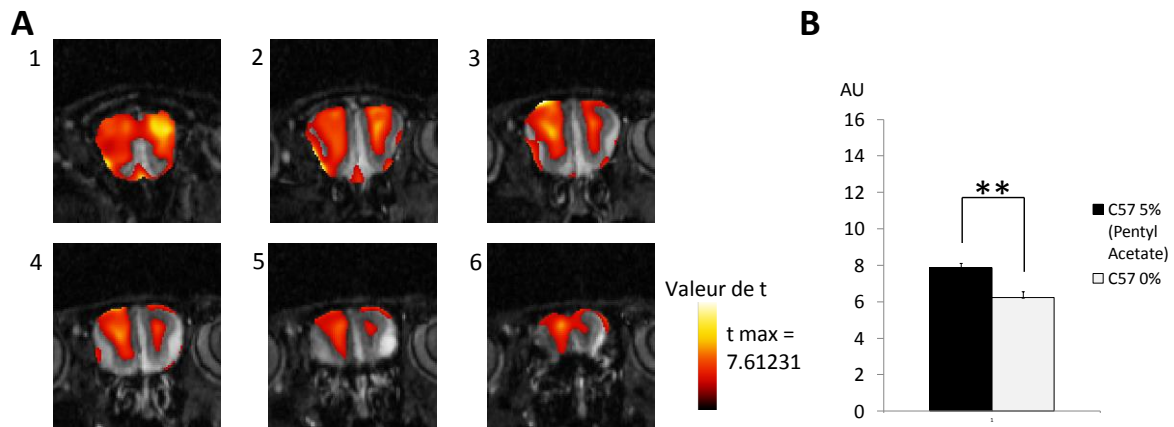


Figure 3.23 Test 8. Comparaison intragroupe de l'activité entre souris témoins stimulées avec 5% de pentylacétate contre des souris témoins stimulées avec de l'air. Valeur du t-test= 0.004.

Nous avons voulu vérifier ceci également chez les animaux ob/ob. Ce test est la comparaison de l'activité des souris ob/ob stimulées avec une odeur de pentylacétate à 5% avec celle des animaux ob/obs ayant été stimulés avec de l'air. Là aussi, le pentylacétate induit une large activation bilatérale du Bo, même celle-ci semble être plus cantonnée à des couches profondes (GCL) (figure 3.23 A). L'intensité moyenne des voxels de la zone mise en évidence chez les animaux témoins stimulés à 5% ($7,27 \pm 0,20$ u.a.) est significativement supérieure à celle des animaux témoins stimulés avec de l'air ($5,25 \pm 0,48$ u.a.) (t-test= 0.0049) (figure 3.23 B). Effectué dans l'autre sens, le test n'indique pas de zone d'activité supérieure chez les animaux témoins stimulés avec de l'air (test 9 inv). Chez les ob/ob, l'activité induite par le pentylacétate semble également différente de celle de l'amande. Il est intéressant de noter que, malgré une zone d'activité plus étendue, il existe comme pour l'amande une forte activité au niveau de la GCL. L'activation du BO semble être différente chez les ob/ob par comparaison avec les animaux témoins, indépendamment du fait que l'odeur présentée soit une odeur neutre ou alimentaire.

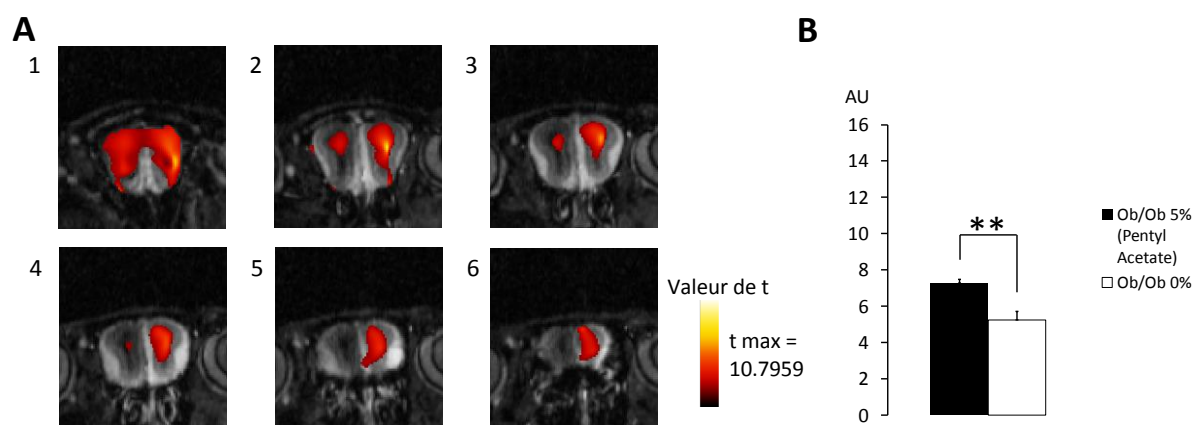


Figure 3.24 Test 9. Comparaison intragroupe de l'activité entre souris ob/ob stimulées avec 5% de pentylacétate contre des souris ob/ob stimulées avec de l'air. Valeur du t-test= 0.005.

Le test suivant consistait à comparer l'activité des souris témoins et des souris ob/ob, les deux groupes étant stimulés avec du pentylacétate à 5%. Les images ont révélé que pour cette odeur, l'activité du BO bilatérale était supérieure chez les témoins, en particulier dans les couches superficielles dorsales (GL) et au niveau de certaines couches profondes (GL, MCL et GCL) (figure 3.24 A). L'intensité moyenne des voxels de la zone mise en évidence chez les animaux témoins stimulés à 5% de pentylacétate ($10,22 \pm 0,40$ u.a.) est significativement supérieure à celle des animaux ob/ob stimulés à 5 % ($8,28 \pm 0,25$ u.a.) (t-test= 0.005) (figure 3.24 B). Effectué dans l'autre sens, le test n'indique pas de zone d'activité supérieure chez les ob/ob stimulés avec l'odeur de pentylacétate inconnue par rapport aux témoins (test 10 inverse).

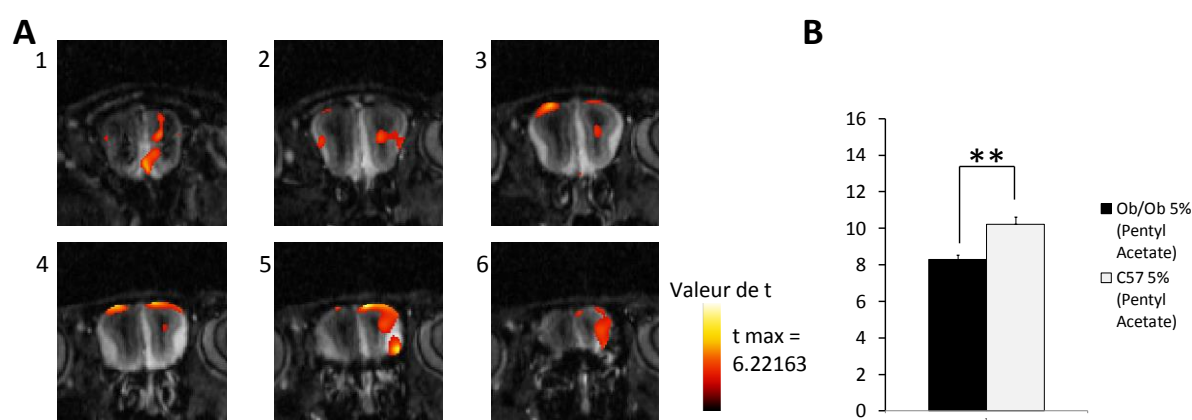


Figure 3.25. Test 10. Comparaison intergroupe de l'activité entre souris témoins stimulées avec 5% de pentylacétate contre des souris ob/ob stimulées avec 5% de pentylacétate. Valeur du t-test= 0.008.

Notre dernier test consistait à comparer l'activité de deux groupes d'animaux obèses stimulés avec de l'amande à 5%, le premier groupe ayant reçu de la pâte sucrée odorisée à l'amande, le second groupe rencontrant pour la première fois l'odeur d'amande. Nous avons observé une légère hausse d'activité dans la GL latérale spécifiquement activée par l'odeur d'amande dans le groupe ayant reçu la pâte sucrée et associé l'odeur d'amande à un aliment. Toutefois, le groupe d'animaux n'ayant pas été habitué à l'amande ne contenait qu'un faible nombre d'animaux ($n=3$), et des animaux supplémentaires sont nécessaires pour augmenter la puissance statistique de ce test.

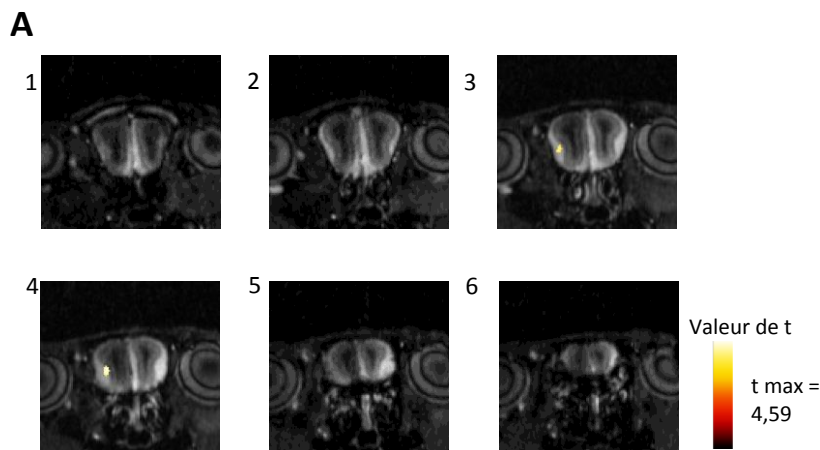


Figure 3.26. Test 11. Comparaison intragroupe de l'activité entre souris ob/ob stimulées avec 5% d'amande et ayant reçu des boulettes odorisées à l'amande contre des souris ob/ob stimulées avec 5% d'amande et n'ayant jamais été exposées à l'amande auparavant.

Pour résumer l'ensemble de ces tests nous proposons une visualisation simplifiée de tous les tests réalisés avec SPM dans le tableau 3.1. Ces résultats nous indiquent les répartitions d'activité spatiale dans le BO suivant l'activation odorante ou l'effet de la leptine ou bien des deux effets.





	N=5 Pour chaque groupe	Témoins	Ob/Ob	Témoins	Ob/Ob	Ob/Ob + leptine	Ob/Ob + leptine	Témoins	Ob/Ob
		Air	Air	Amande 5%	Amande 5%	Air	Amande 5%	Pentyl acétate 5%	Pentyl acétate 5%
	Témoins Air		Test 2 inv	Test 1 inv				Test 8 inv	
	Ob/Ob Air	Test 2			Test 4 inv	Test 5 inv			Test 9 inv
	Témoins Amande 5%	Test 1			Test 3 inv		Test 7 inv		
	Ob/Ob Amande 5% 5%		Test 4	Test 3			Test 6 inv		
	Ob/Ob + leptine Air		Test 5						
	Ob/Ob + leptine Amande 5%			Test 7	Test 6				
	Témoins Pentyl acétate 5%	Test 8							Test 10
	Ob/Ob Pentyl acétate 5%		Test 9					Test 10 inv	

Tableau 3.1 Récapitulatif des différents tests réalisés avec SPM. Une seule tranche issue de la partie médiale de l’axe antéropostérieur est montrée pour chaque test. Les images montrent les voxels qui sont statistiquement supérieurs dans le groupe de la colonne de gauche comparé au groupe de la 1ère ligne. Une absence de pixels colorés sur une image du BO indique une absence de différence entre les deux groupes comparés dans le sens indiqué.

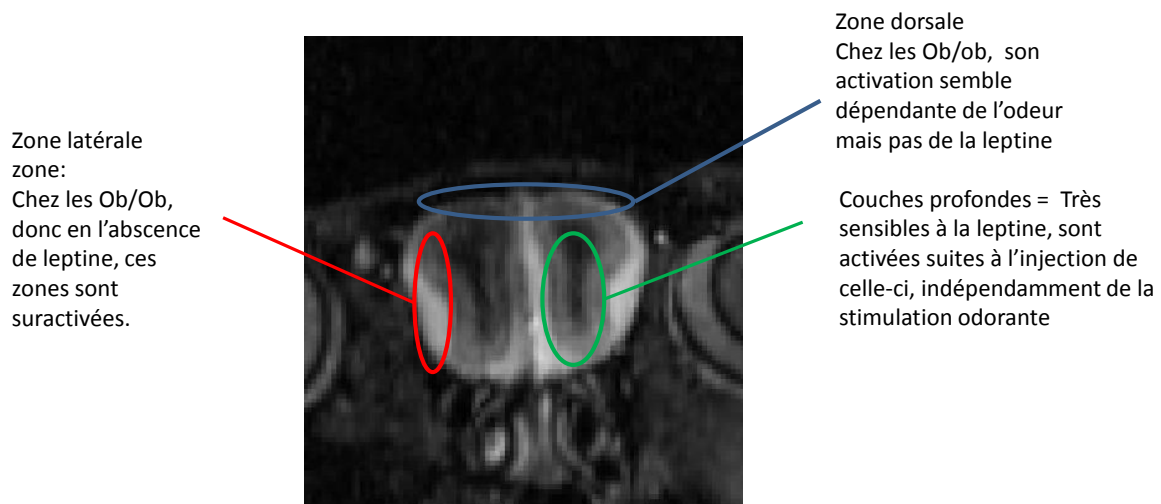


Figure 3.27. Schéma récapitulant la localisation des zones de sensibilité à l'odeur et à la leptine dans le BO de souris ob/ob versus souris témoins.

6. Neurogenèse

En comparant le taux de survie des interneurons néoformés dans le BO, nous avons observé une augmentation significative la densité d' interneurons marqués au BrDU dans le BO de souris ob/ob (n=6) en les comparant au marquage observé chez des souris témoins, à la fois pour les CG, pour lesquelles nous avons constaté une augmentation de la survie de ces nouveaux neurones de 15.6% par rapport aux témoins ($p=0,042$), et pour les PGC, pour lesquelles nous avons constaté une augmentation de la survie de 27.6% par rapport aux témoins ($p=0.016$) (figure 3.26). Ces résultats nous permettent de conclure que l'absence de leptine augmente la survie cellulaire des neurones nouvellement formés du BO, même si nous ne pouvons préciser si cette survie est augmentée pour l'ensemble des PGC ou seulement pour certaines sous-catégories.

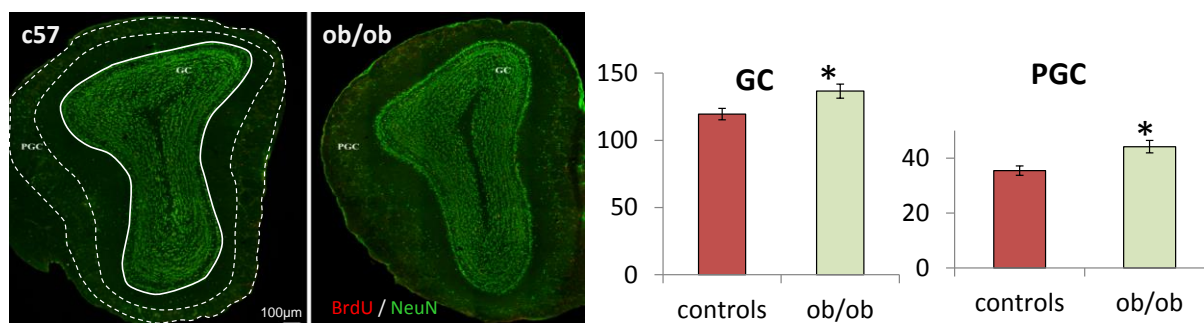


Figure 3.28. Marquage au BrdU indiquant la survie des néoneurones dans le BO. L'étoile indique une différence significative entre les deux groupes. GC : granule cells. PGC : periglomerular cells.

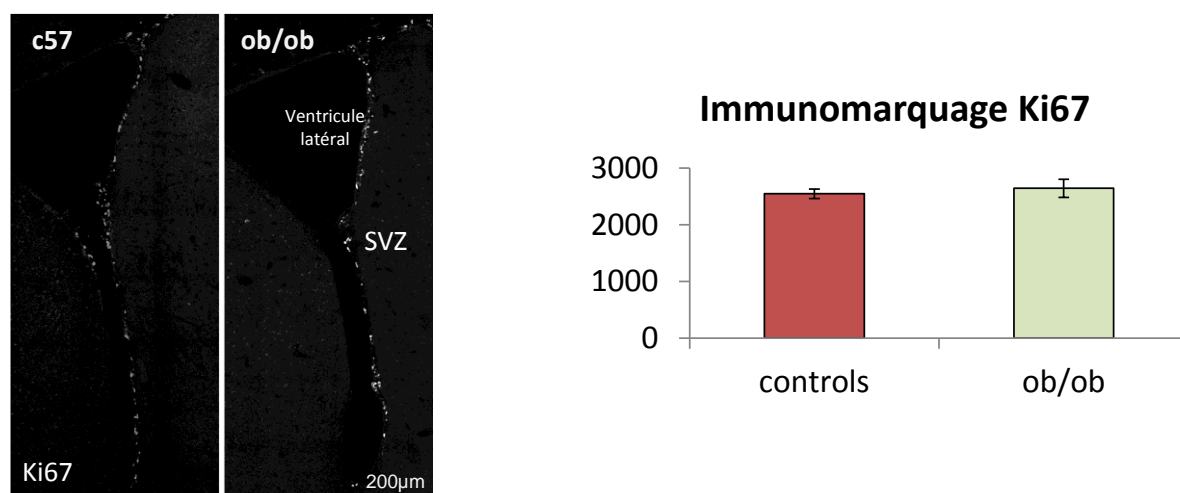


Figure 3.29 Immunomarquage au Ki67 indiquant le taux de prolifération des nouveaux neurones dans la SVZ. Il n'existe pas de différence significative entre les deux groupes.

En comparant les taux de prolifération dans la SVZ, nous n'avons pas observé de différence significative au niveau de la densité de cellules marquées avec Ki67 entre les animaux témoins (n=7) et les animaux ob/ob (n=4) (figure 3.27). Ces résultats nous permettent de conclure que l'absence de leptine chez les animaux ob/ob ne semble pas impacter la prolifération cellulaire dans la SVZ.

7. R_tPCR

Il a été montré à plusieurs reprises que dans le cerveau des modèles murins de l'obésité de type DIO, une neuroinflammation forte existait dans plusieurs structures cérébrales, surtout dans l'hippocampe et l'hypothalamus. Or il a été aussi montré qu'une activation microgliale pouvait fortement influencer le signal MEMRI puisque ces cellules ont un tropisme fort pour le manganèse et l'accumulent (Widerøe et al., 2009). Les différences de signal MEMRI auraient donc pu être liées à l'accumulation aspécifique microgliale du manganèse dans un BO qui aurait pu être en état inflammatoire. Pour tester cette hypothèse nous avons effectué une quantification de différents transcrits de protéines neuronales et gliales dans le BO.

Aucune variation significative par rapport aux deux transcrits endogènes ubiquitaire (housekeeping : TPB, rpL19) n'a pu être détectée pour les marqueurs testés exceptés pour la GFAP (Δ de variation par rapport aux gènes « housekeeping » = 16.5, $p = 0.0025$, test de Student). Les autres marqueurs astrocytaires comme GLAST ($\Delta = -4$, $p = 0.6$) et GLT1 ($\Delta = -1.9$, $p = 0.7$), le marqueur le plus utilisé pour les cellules microgliales (IBA ; $\Delta = 0.2$; 0.82) ou les OSN (OMP ; $\Delta = 10.54$; $p = 0.65$), sont stables chez les ob/ob. Pour être sûr de l'absence de réactivité microgliale, témoin majeur d'une inflammation en présence de cette variation inhabituelle de GFAP, deux autres marqueurs ont été quantifiés. Il s'agit de MAC1-CD11b ($\Delta = -0.81$; $p = 0.88$) et de ED1-CD68 ($\Delta = -13.23$; $p = 0.07$) qui ne varient donc pas.

En conclusion de cette série d'expérience consacrée à la quantification des transcrits, exceptée pour la réactivité GFAP, le BO des ob/ob ne présente pas de signe évident d'une forte inflammation qui aurait pu expliquer l'augmentation du signal MEMRI.

8. Test de discrimination olfactive et enregistrement des réponses électrophysiologiques en LFP.

Une fois les souris implantées et placées individuellement dans les cages d'hébergement, nous n'avons observé aucun changement dans le bien-être des animaux, pas de signe de gêne ou de douleur lors de la tâche expérimentale. Cette expérience a été répétée 4 fois lors de cette étude, sur des groupes d'animaux différents mais de même âge. Lors de la phase d'habituation avec l'odeur d'eugénol, nous n'avons pas constaté de différence entre les souris obèses et témoins, qui ont toutes atteint le critère de réussite de la phase d'habituation en 4 ± 1 sessions. Lors de la phase d'apprentissage du 1^{er} groupe avec l'hexanal en tant qu'odeur Go et le butyraldéhyde en tant qu'odeur NoGo, nous avons constaté

un manque de motivation et de mobilité des souris ob/ob, qui n'effectuaient pratiquement aucun essai alors même que les animaux témoins semblaient avoir acquis la tâche. Les ob/ob attendaient devant le port à odeur et vérifiaient de temps à autre si la récompense avait été distribuée, et effectuaient un nombre d'essais significativement réduit (moyenne d'essais par jour sur 6 jours : 19 ± 9) par rapport aux animaux témoins (moyenne d'essais par jour sur 6 jours : 40 ± 0) ($p < 0.001$). Même si nous avons constaté nous même une mobilité moindre de ces animaux lors de nos expériences précédentes, notamment lors des mises à jeun, ils étaient trop jeunes pour exprimer une motricité quasi-nulle. Il nous a semblé qu'ils souffraient d'un problème motivationnel. Pour tester cette hypothèse, nous avons remplacé l'eau normale délivrée au port à récompense par de l'eau sucrée (0.06 g/ml) (figure 3.28.). Les animaux ob/ob ont connu un regain de motivation presque immédiat : le nombre d'essais a augmenté de façon prononcée (moyenne d'essais par jour sur 6 jours : 38 ± 6) et n'était plus significativement différent de celui des animaux témoins ($p = 0.18$), et les animaux ob/ob ont présenté une capacité d'apprentissage identique à celle des témoins, aussi bien dans la durée nécessaire pour maîtriser la tâche que dans la progression journalière, évaluée grâce au nombre d'essais (réussis ou non) effectués par minute et par séance (mais toujours dans une limite de 40 essais par séance (figure 3.27) : ob/ob = $2,60 \pm 1,24$ essais par minute après ajout de sucre, contre $2,67 \pm 0.79$ pour les animaux témoins (Différence non significative, $p = 0.56$). Ainsi, *in fine* plus d'essais ont été nécessaires aux animaux obèses pour parvenir au critère d'apprentissage, mais, après l'attribution d'eau sucrée comme récompense, les animaux ont récupéré une dynamique d'apprentissage qui ressemblait aux caractéristiques des souris témoins. L'addition de sucre n'a pas non plus perturbé les témoins. Seuls les résultats des groupes ultérieurs ont été pris en compte, lorsque tous les animaux ont reçu un renforcement hydrique sucré et démarré la tâche dans des conditions identiques.

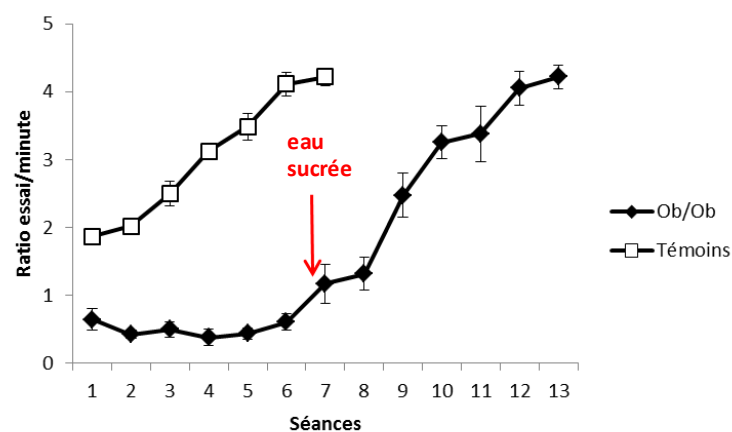


Figure 3.30: Courbes illustrant la motivation des souris : Elles indiquent la fréquence de tous les essais (bon et mauvais) par rapport à la durée de chaque séance, pour chaque séance et pour les souris témoins et les souris ob/ob. La flèche rouge indique le jour où du sucre a été ajouté à la récompense hydrique pour les souris obèses ob/ob. La durée du test a été rallongée pour ces souris.

8.1 Courbes d'apprentissage illustrant la progression des animaux au cours de la tâche Go/NoGo pour trois groupes expérimentaux différents

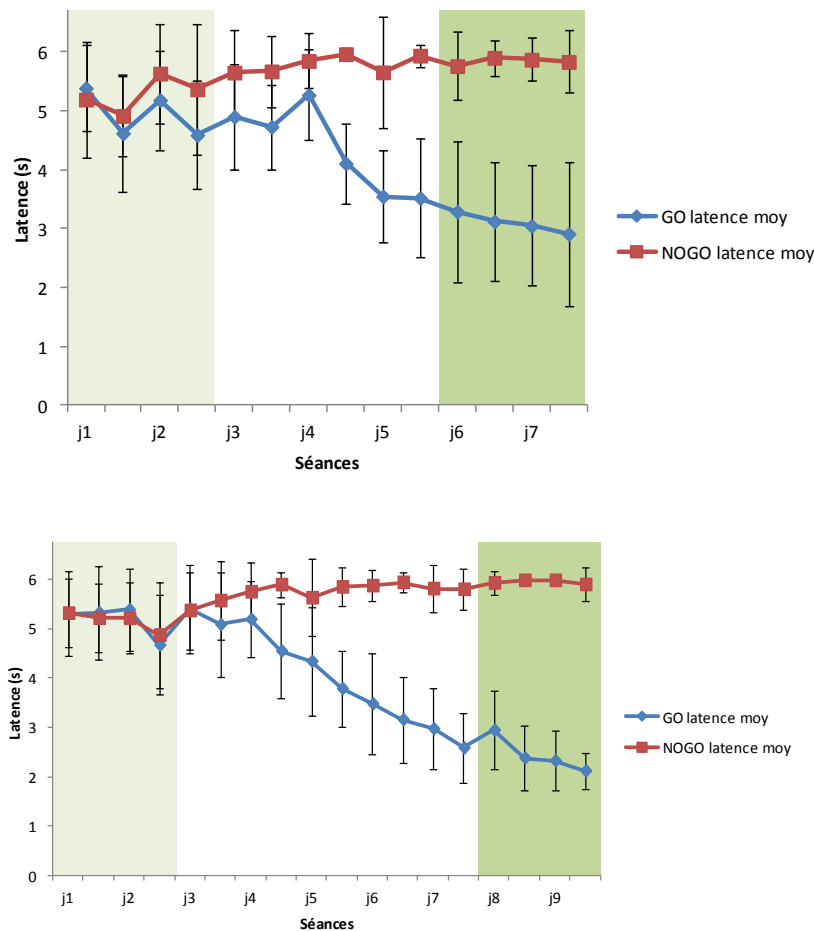
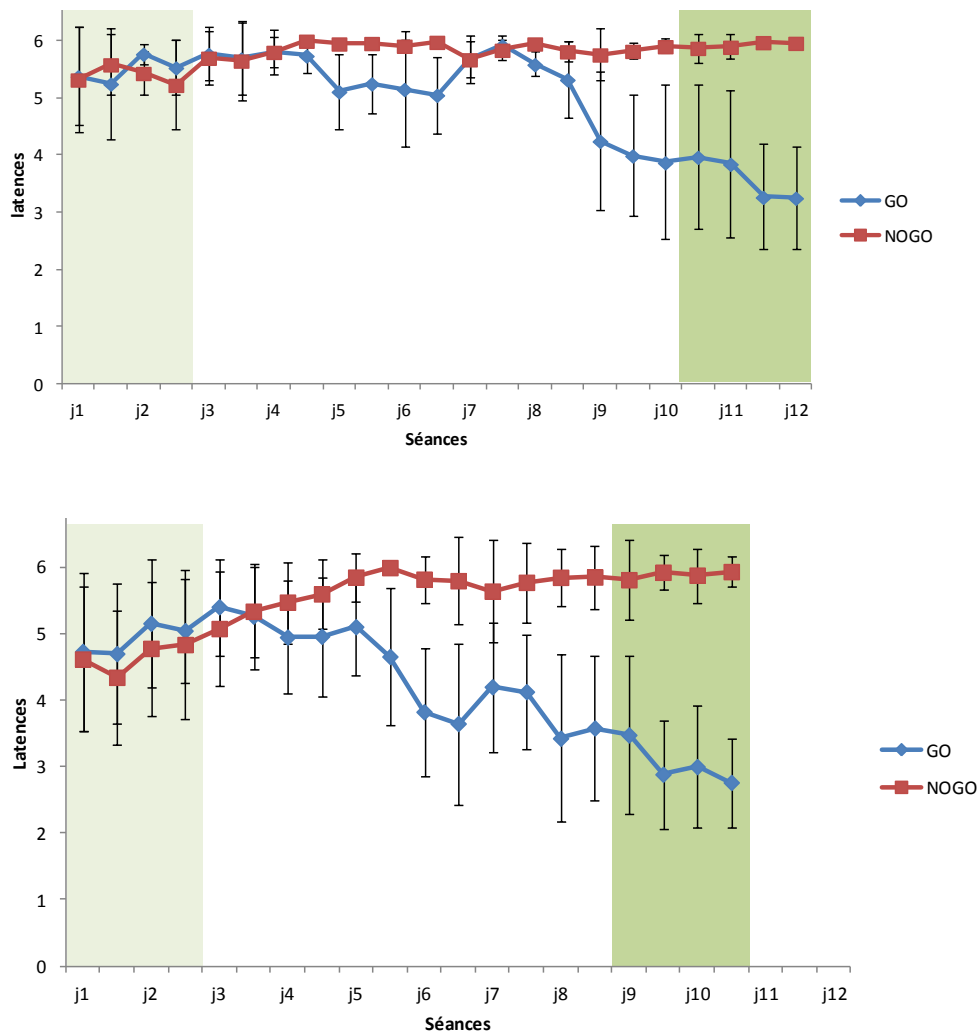


Figure 3.31 Comparaison des courbes d'apprentissage des animaux du groupe 1 (haut : ob/ob, n= 3; bas : contrôles n= 5). Les courbes représentent l'évolution de la latence moyenne de la réponse comportementale (le temps que met l'animal pour aller du port à odeur vers le port à récompense après échantillonnage de l'odeur). Chaque point représente la moyenne des latences par blocs de 10 essais pour chaque odeur. Un intervalle de 6s est la durée maximale d'un essai: un essai Go est réussi si la latence de réponse est inférieure à 6s, un essai NoGo est réussi si la latence de réponse est égale ou supérieure à 6s. Les courbes permettent de distinguer les différentes phases d'apprentissage de la tâche de discrimination olfactive. La partie colorée en vert clair indique le stade débutant, lors duquel les animaux débutent la tâche et ne discriminent pas les deux odeurs. La partie colorée en vert sombre indique le stade expert, pendant lequel les animaux ont tous atteint le critère d'apprentissage et discriminent de façon nette les deux odeurs. Odeur Go : Hexanal 10 % ; odeur NoGo : Butyraldéhyde 15 %. En haut: Les résultats obtenus chez les animaux obèses montrent que les animaux commencent à dissocier les odeurs à partir de 4 jours : la latence de réponse pour l'odeur NoGo augmente tandis que celle pour l'odeur Go diminue. Ils atteignent tous le critère d'apprentissage après 6 jours. En bas : Les résultats obtenus chez les animaux témoins montrent que les animaux commencent à dissocier les odeurs à partir de 5 jours : la latence de réponse pour l'odeur NoGo augmente tandis que celle pour l'odeur Go diminue. Ils atteignent tous le critère d'apprentissage après 8 jours.



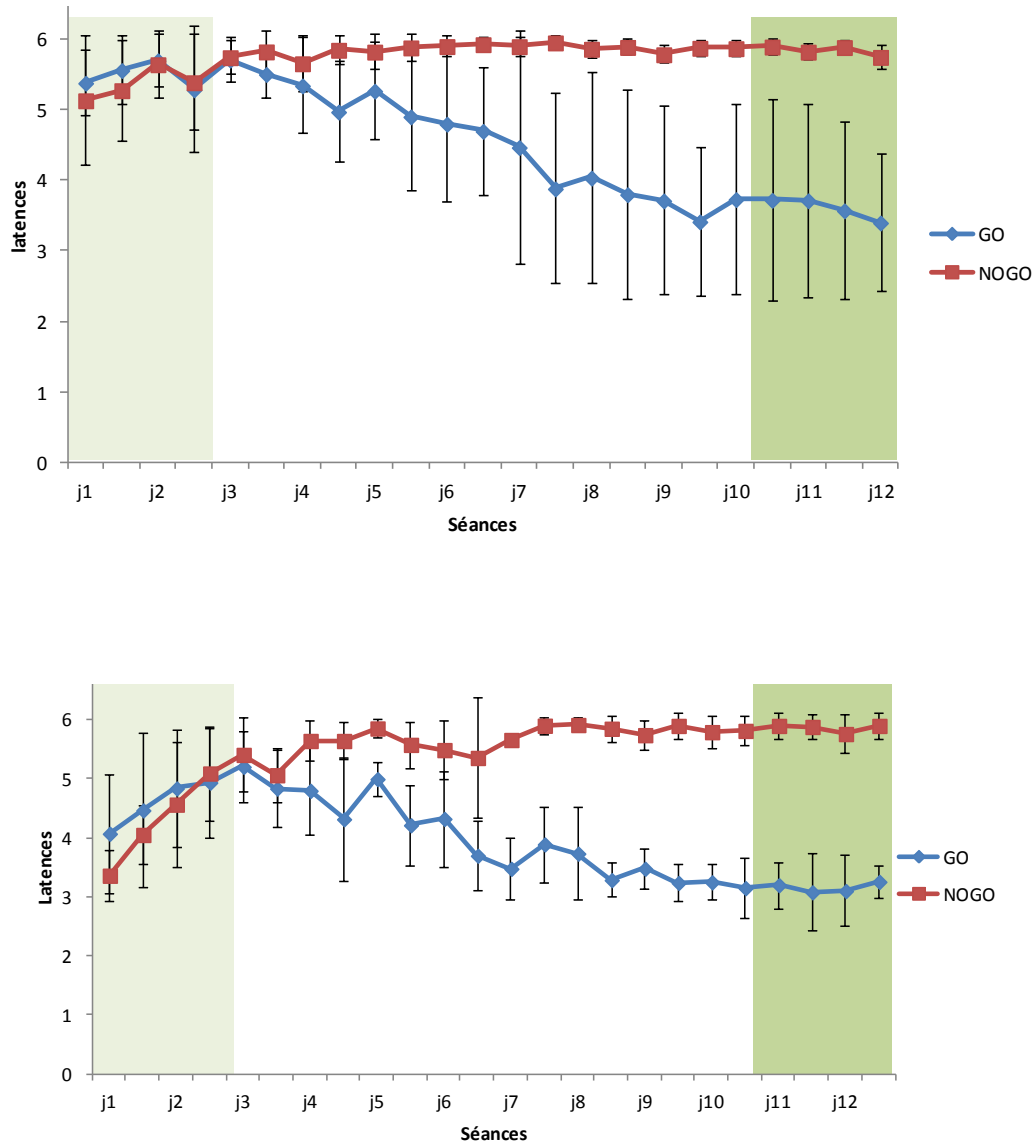


Figure 3.33. Comparaison des courbes d'apprentissage des animaux du groupe 3 (haut : ob/ob, n= 5; bas : contrôles n= 5). Odeur Go : Hexanal 10 % ; odeur NoGo : Butyraldéhyde 15 %. En haut : Les résultats obtenus chez les animaux obèses montrent que les animaux commencent à dissocier les odeurs après 7 jours: la latence de réponse pour l'odeur NoGo reste élevée tandis que celle pour l'odeur Go diminue. Ils atteignent tous le critère d'apprentissage après 10.5 jours. En bas : Les résultats obtenus chez les animaux témoins montrent que les animaux commencent à dissocier les odeurs après 6 jours: la latence de réponse pour l'odeur NoGo augmente tandis que celle pour l'odeur Go diminue. Ils atteignent tous le critère d'apprentissage après 11 jours.

8.2 Description des différentes étapes d'apprentissage au cours de la tâche de discrimination olfactive Go/NoGo

Dans les 3 groupes, les différentes étapes de l'apprentissage sont clairement identifiables (figures 3.29, 3.30, 3.31). Les animaux sont « débutants » lors des premières séances, lorsque les courbes de latence de réponse à chaque odeur ne sont pas clairement dissociées : ainsi en début d'apprentissage, les animaux ont exprimé le même comportement quelle que soit l'odeur échantillonnée (hexanal ou butyraldéhyde), et les courbes de latence n'étaient pas dissociées.

Nous avons constaté une différence dans la stratégie d'apprentissage de la tâche entre les animaux ob/ob et les témoins, en particulier dans les groupes 2 et 3 : les animaux témoins présentaient des latences faibles dès le départ de l'expérience, et ils allaient et venaient de façon frénétique entre le point d'échantillonnage et le port à récompense en espérant obtenir de l'eau sucrée, quelle que soit l'odeur présentée. Au contraire, les animaux obèses semblaient perturbés par la nouvelle paire d'odeur, et échantillonnaient précautionneusement le port à odeur avant de se déplacer vers le port à récompense, comme pour économiser leur énergie.

Lorsque les courbes de latence commencent à se dissocier, les témoins apprennent à s'immobiliser pendant la présentation de l'odeur non renforcée (NoGo) (augmentation de la latence moyenne de réponse, qui tend vers un maximum de 6 secondes) et au contraire, lors de la présentation de l'odeur renforcée (Go), ils diminuent de plus en plus le temps de réponse (qui tend vers 3 secondes). Les animaux obèses eux, maintiennent leur immobilité pendant la présentation de l'odeur NoGo mais diminuent progressivement le temps de réponse lorsqu'ils sont exposés à l'odeur Go (qui tend également vers 3 secondes).

Pour le groupe 2, nous avons constaté une chute des performances et une augmentation de la latence de réponse pour l'odeur Go au 7^{ème} jour de l'expérience, pour tous les animaux (figure 3.29). Il s'agit peut-être d'un effet expérimentateur : au cours de cette journée, Claire Martin m'a remplacé pour surveiller l'expérience. Malgré le fait que durant cette tâche largement automatisée, l'interaction directe avec les animaux soit réduite (consistant simplement à les placer et les retirer de la cage), la littérature décrit le fait que les animaux sont capables de distinguer un expérimentateur familier d'un expérimentateur inhabituel (Davis et al., 1997; Van Driel and Talling, 2005). Par ailleurs, il a été montré très récemment que les rongeurs étaient très sensibles aux odeurs de mammifères mâles, y compris celle d'expérimentateurs humains, et que celles-ci étaient susceptibles de déclencher un stress non négligeable (Sorge et al., 2014). De fait, remplacer l'expérimentateur habituel par un expérimentateur de sexe différent peut avoir un impact non négligeable sur le comportement des animaux, et pourrait expliquer en partie la variation de performance des animaux du groupe 2 au cours de cette journée. Les animaux sont tout de même parvenus au critère d'apprentissage par la suite.

On considère les animaux comme étant parvenus au stade « experts » dans la tâche de discrimination olfactive lorsqu'ils atteignent le critère de succès qui est fixé à moins de 4 ± 2 mauvais essais par bloc de 40 essais deux jours de suite. Les courbes de latence sont alors complètement dissociées (figures 3.28, 3.29, 3.30). Le nombre d'essais nécessaire pour atteindre le critère de réussite chez les animaux ob/ob est de 205 ± 42 essais ; 387 ± 31 essais et 357 ± 110 essais, pour les groupes 1, 2 et 3, respectivement. Le nombre d'essais nécessaire pour atteindre le critère de réussite chez les animaux témoins est de 256 ± 78 essais, 273 ± 80 essais et 320 ± 94 essais pour les groupes 1, 2 et 3, respectivement.

Nous avons vérifié que tous les groupes ont correctement appris la tâche en comparant les latences moyennes de réponse pour l'odeur Go lors des deux premiers jours de comportement et lors des deux derniers (lorsque chaque souris arrivait au critère d'apprentissage deux jours de suite). Les analyses, réalisées grâce au test non paramétrique de Mann-Whitney, ont montré un apprentissage correct dans tous les groupes avec des différences significatives entre animaux débutants et experts. Groupe 1, ob/ob : $p = 0.0004$, $U = 11.0$; animaux témoins : $p < 0.0001$, $U = 9$ / Groupe 2 : ob/ob : $p < 0.0001$, $U = 17$, animaux témoins : $p < 0.0001$, $U = 59$ / Groupe 3 : ob/ob : $p < 0.0001$, $U = 23$, animaux témoins : $p = 0.0001$, $U = 49$. Nous avons également vérifié que les animaux discriminaient correctement les deux odeurs en comparant les différences de latences entre odeur Go et odeur NoGo au cours des deux derniers jours d'apprentissage, et là aussi les différences étaient significatives dans tous les groupes. Groupe 1 : ob/ob : $p = 0.0001$, $U = 49.5$; animaux témoins : $p < 0.0001$, $U = 0$ / Groupe 2 : ob/ob : $p < 0.0001$, $U = 3$, témoins : $p < 0.0001$, $U = 0$ / Groupe 3 : ob/ob : $p < 0.0001$, $U = 1$, témoins : $p = 0.0001$, $U = 0$. Les éventuelles différences comportementales dans la vitesse d'apprentissage de la tâche ont été évaluées en comparant le nombre d'essais pour arriver au premier jour du critère d'apprentissage grâce au test non paramétrique de Mann-Whitney. Pour les groupes 1 et 3, il n'y a pas de différence comportementale entre animaux obèses et témoins (groupe 1 : $p = 0.46$; $U = 5.0$ et groupe 3 : $p = 0.53$; $U = 9.5$). Pour le groupe 2, il semblerait que les animaux témoins apprennent significativement plus vite ($p = 0.019$; $U = 1.0$). Malheureusement, la seule différence significative de comportement entre animaux ob/ob et témoins étant observée dans le groupe 2, dans lequel l'apprentissage des animaux a été perturbé par un changement d'expérimentateur, ce qui ne nous permet pas de mettre en évidence une différence claire de performance dans les capacités de discrimination olfactive.

8.3 Analyse des réponses oscillatoires enregistrées au cours de la tâche de discrimination olfactive Go/NoGo

L'objectif de cette étude était de mettre en évidence d'éventuelles différences dans la représentation temporelle des odeurs et la puissance des différentes bandes de fréquences, mais aussi de comprendre si l'apprentissage influençait les réponses oscillatoires de la même manière chez les animaux témoins et chez les animaux ob/ob.

Des performances comportementales similaires n'impliquent pas que les animaux obèses perçoivent les odeurs strictement de la même manière. Au cours de cette expérience de discrimination olfactive, les animaux étaient systématiquement reliés à un dispositif permettant de mesurer en temps réel les réponses oscillatoires induites par la paire d'odeurs du test et d'associer, via un logiciel informatique, chaque essai comportemental correspondant. Nous nous sommes particulièrement intéressés à 2 bandes de fréquences qui ont été décrites dans le chapitre précédent : la bande Bêta entre 15 et 40 Hz, et la bande Gamma entre 60 et 100 Hz. Le logiciel d'acquisition nous a permis d'enregistrer le potentiel de champ local pendant 3 secondes avant l'arrivée de l'odeur, pendant (2 sec) et 2 secondes après la délivrance de l'odeur au cours de chaque essais. Nous avons comparé la puissance oscillatoire de pavés temps-fréquences (qui est la représentation de la moyenne des fréquences enregistrées pour une fréquence donnée et à un temps donné) enregistrée pendant la durée de l'échantillonnage (de la seconde 3 à la seconde 4, que nous appellerons « stim ») à celle enregistrée en ligne de base, juste avant la stimulation (de la seconde 1 à la seconde 2, que nous appellerons « pré »). Afin de comparer la plasticité des dynamiques oscillatoires entre les animaux ob/ob et témoin, nous avons comparé les activités des deux premiers jours de l'expérience, lorsque les animaux étaient « débutants », à ceux des deux derniers jours, lorsque les animaux sont parvenus au critère d'apprentissage et sont considérés comme « experts ». Tous les signaux exploitables ont été comparés grâce à des ANOVA à mesures répétées.

Il convient de préciser avant nos analyses qu'en terme d'oscillations, il n'y pas de différence significative entre la puissance des oscillations évoquées par l'odeur Go (hexanal) et celle de l'odeur NoGo (butyraldéhyde), et ce pour tous les groupes. De fait, nous avons choisi de regrouper les oscillations évoquées par les deux odeurs, ce qui est en ligne avec la littérature scientifique. Par ailleurs, la puissance des oscillations mesurées dans les animaux du groupe 3 est significativement plus faible que dans les groupes 1 et 2 ($p < 0.0001$). Si nous ne sommes pas parvenus à l'expliquer, nous avons constaté que cette diminution de puissance affectait de façon équivalente animaux témoins et obèses et que l'évolution du signal était équivalente à celle des autres groupes, et nous avons donc choisi d'étudier l'évolution du signal au sein des trois expériences plutôt que de nous intéresser à des moyennes de puissance oscillatoire brute.

8.3.1 Oscillations bêta (15-40 Hz) chez des animaux débutants

On considère que les animaux répondent à l'odeur s'il y a une différence statistiquement significative entre les puissances oscillatoires des pavés entre la période contrôle « pré » et la période de stimulation « stim ». Cette différence existe chez nos animaux débutants, à la fois pour les ob/ob (pré= $0,090 \pm 0,0028 \mu V^2$; stim= $0,1 \pm 0,004 \mu V^2$ pour le groupe 1 ; pré= $0,078 \pm 0,0024 \mu V^2$; stim= $0,080 \pm 0,002 \mu V^2$ pour le groupe 2 et pré= $0,032 \pm 0,0003 \mu V^2$; stim= $0,041 \pm 0,0007 \mu V^2$ pour le groupe 3, $p < 0.0001$ pour les 3 groupes) et pour les témoins (pré= $0,087 \pm 0,0032 \mu V^2$; stim= $0,093 \pm 0,0035 \mu V^2$ pour le groupe 1 ; pré= $0,043 \pm 0,0009 \mu V^2$; stim= $0,043 \pm 0,0009 \mu V^2$ pour le groupe 2 et pré= $0,036 \pm 0,0004 \mu V^2$; stim= $0,045 \pm 0,0006 \mu V^2$ pour le groupe 3, $p < 0.0001$ pour les 3 groupes). Les groupes d'animaux semblent donc bien détecter les odeurs présentées, même dans les premiers stades de la tâche de discrimination olfactive. Il est à noter qu'il n'y a pas de différence significative entre les groupes témoins et obèses pour cette augmentation entre période « pré » et « stim » ($p=0.2725$). On remarque également qu'excepté pour le groupe 2, l'augmentation de puissance dans la bande bêta entre les périodes « stim » et « pré » est identique entre ob/ob et témoins. Le test ANOVA n'indique pas de différence significative pour la comparaison de l'ensemble des groupes ($p=0,0512$). Ces résultats sont représentés dans la figure 3.32.

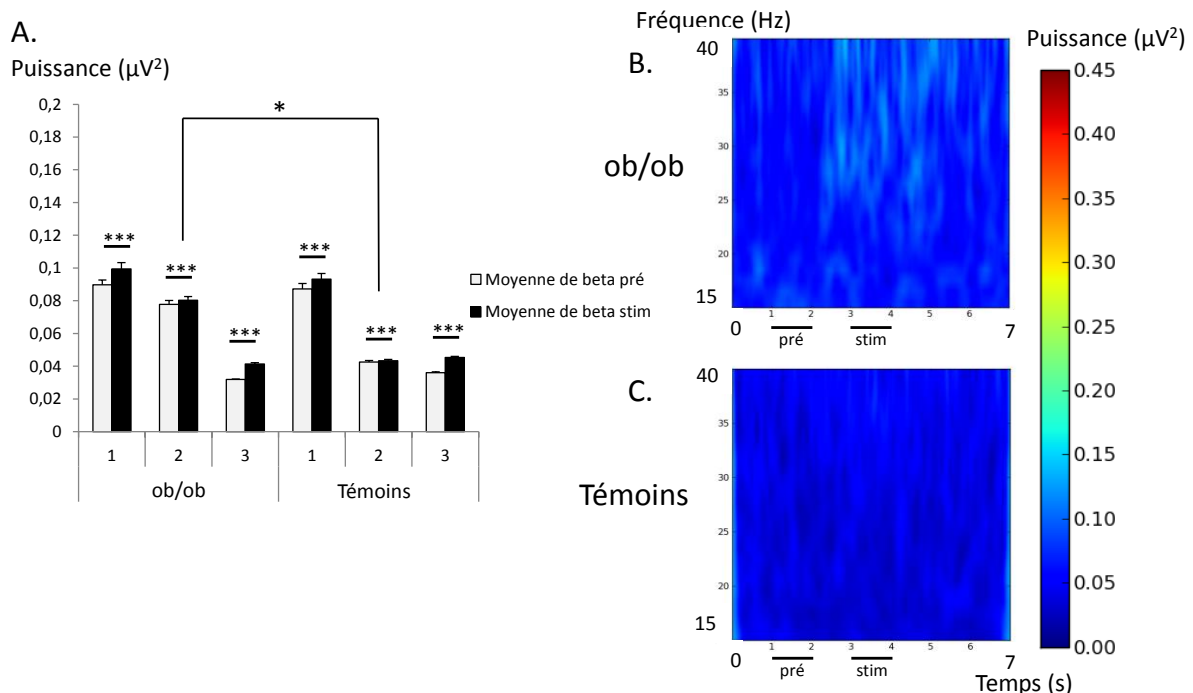


Figure 3.34 Moyenne de la puissance des pavés temps-fréquence des oscillations bêta par groupe et par Go/NoGo (Débutants) A : Moyenne de puissance des pavés temps-fréquence de la bande bêta de tous les animaux au stade débutants, c'est-à-dire au 1er et au 2ème jour de l'apprentissage, classés de 1 à 3 par expérience et par groupe, ob/ob ou témoins. En blanc, les histogrammes représentent le signal enregistré pendant

la période « pré » en l'absence d'odeur. En noir, les histogrammes représentent le signal enregistré pendant la période « stim », en présence d'odeur. A noter que pour le groupe 2, on observe une différence significative de puissance des oscillations (à la fois en période pré et stim) entre ob/ob et témoins et de la différence entre période « pré » et « stim ». B : Carte représentative des pavés temps-fréquence de la bande bêta moyennée sur l'ensemble des 40 essais de la première journée d'apprentissage d'une souris ob/ob du groupe 2. C : Carte représentative des pavés temps-fréquence de la bande bêta moyennée sur l'ensemble des 40 essais de la première journée d'apprentissage d'une souris témoin du groupe 2.

8.3.2 Oscillations Bêta chez des animaux experts

Nous avons par la suite analysé les oscillations bêta chez des animaux experts. Il est décrit dans la littérature (voir chapitre 1) que les oscillations bêta sont liées à l'apprentissage et augmentent à mesure que les animaux apprennent à reconnaître les odeurs au cours de la tâche de discrimination olfactive. Nous avons tout d'abord vérifié, comme pour les animaux débutants, s'il existait une différence statistiquement significative entre les puissances oscillatoires des pavés entre la période contrôle « pré » et la période de stimulation « stim » : pour les ob/ob (pré= $0,098 \pm 0,0021 \mu V^2$; stim= $0,180 \pm 0,0042 \mu V^2$ pour le groupe 1; pré= $0,114 \pm 0,0038 \mu V^2$; stim= $0,181 \pm 0,0068 \mu V^2$ pour le groupe 2 et pré= $0,05 \pm 0,0003 \mu V^2$; stim= $0,099 \pm 0,005 \mu V^2$ pour le groupe 3, $p < 0.0001$ pour les 3 groupes) et pour les témoins (pré= $0,086 \pm 0,0027 \mu V^2$; stim= $0,113 \pm 0,0043 \mu V^2$ pour le groupe 1; pré= $0,109 \pm 0,0018 \mu V^2$; stim= $0,124 \pm 0,0020 \mu V^2$ pour le groupe 2 et pré= $0,038 \pm 0,0006 \mu V^2$; stim= $0,062 \pm 0,0011 \mu V^2$ pour le groupe 3, $p < 0.0001$ pour les 3 groupes) . Qu'il s'agisse des animaux ob/ob ou témoin, l'augmentation d'activité de la bande bêta entre les périodes « pré » et « stim » est bien plus importante chez les animaux experts que chez les animaux débutants ($p < 0.0001$) (figure 3.33). De plus, la différence entre la période « pré » et « stim » est bien plus importante chez les ob/ob ($p < 0.0001$), et la puissance des oscillations pendant la période « stim » l'est également ($p < 0.0001$). Ainsi, comme attendu tous les animaux expriment une augmentation sensible de la puissance des oscillations bêta en réponse à une odeur suite à la maîtrise de la tâche de discrimination olfactive, mais cette réponse est sensiblement plus puissante chez les animaux obèses (figure 3.33) Il semblerait donc que la réponse oscillatoire dans la bande bêta soit modulée chez les animaux ob/ob, mais de façon dépendante de l'apprentissage olfactif.

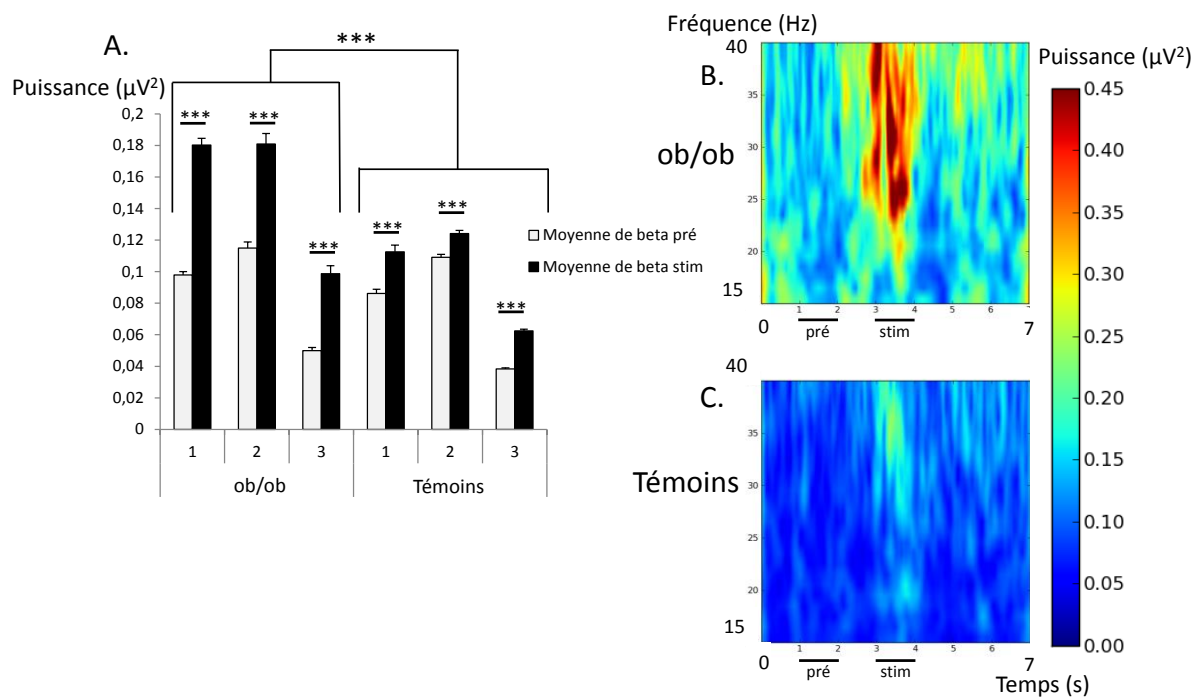


Figure 3.35 Moyenne de la puissance des pavés temps-fréquence des oscillations bêta par groupe et par Go/NoGo (Experts) A : Moyenne de puissance des pavés temps-fréquence de la bande bêta de tous les animaux au stade experts, c'est-à-dire aux deux derniers jours de l'apprentissage, classés de 1 à 3 par expérience et par groupe, ob/ob ou témoins. En blanc, les histogrammes représentent le signal enregistré pendant la période « pré » en l'absence d'odeur. En noir, les histogrammes représentent le signal enregistré pendant la période « stim », en présence d'odeur. B : Carte représentative des pavés temps-fréquence de la bande bêta moyennée sur l'ensemble des 40 essais de la dernière journée d'apprentissage d'une souris ob/ob du groupe 2. C : Carte représentative des pavés temps-fréquence de la bande bêta moyennée sur l'ensemble des 40 essais de la dernière journée d'apprentissage d'une souris témoin du groupe 2.

8.3.3. Oscillations gamma (60-100 Hz) chez des animaux débutants

Nous nous sommes ensuite intéressés aux oscillations gamma chez des animaux débutants. On considère que les animaux répondent à l'odeur s'il y a une différence statistiquement significative entre les puissances oscillatoires des pavés entre la période contrôle « pré » et la période de stimulation « stim ». Cependant, à l'inverse des oscillations bêta, la présentation d'une odeur induit plutôt une baisse de la puissance oscillatoire. Cette différence existe chez nos animaux débutants, à la fois pour les ob/ob (à l'exception du groupe 1, où il n'y a pas de différence significative) ($\text{pré} = 0,063 \pm 0,0024 \mu V^2$; $\text{stim} = 0,064 \pm 0,0026 \mu V^2$ pour le groupe 1 ; $\text{pré} = 0,056 \pm 0,0020 \mu V^2$; $\text{stim} = 0,053 \pm 0,002 \mu V^2$ pour le groupe 2 et $\text{pré} = 0,022 \pm 0,0002 \mu V^2$; $\text{stim} = 0,018 \pm 0,0007 \mu V^2$ pour le groupe 3, $p < 0,0001$ pour les groupes 2 et 3) et pour les témoins ($\text{pré} = 0,051 \pm 0,0016 \mu V^2$; $\text{stim} = 0,044 \pm 0,0011 \mu V^2$ pour le groupe 1 ; $\text{pré} = 0,041 \pm 0,00073 \mu V^2$; $\text{stim} = 0,037 \pm 0,0005 \mu V^2$ pour le groupe 2 et $\text{pré} = 0,024 \pm 0,0002 \mu V^2$; $\text{stim} = 0,023 \pm 0,0002 \mu V^2$ pour le groupe 3, $p < 0,0001$ pour les 3

groupes). Les groupes d'animaux semblent donc bien détecter les odeurs présentées, même dans les premiers stades de la tâche de discrimination olfactive. Même si dans chaque groupe de souris ob/ob et témoins débutants, il existe une diminution de gamma entre période « pré » et « stim » ($p < 0,0001$) (excepté dans le groupe 1 ob/ob ; non significatif), il est à noter que les différences de puissance sont très variables d'un groupe à l'autre (Figure 3.34).

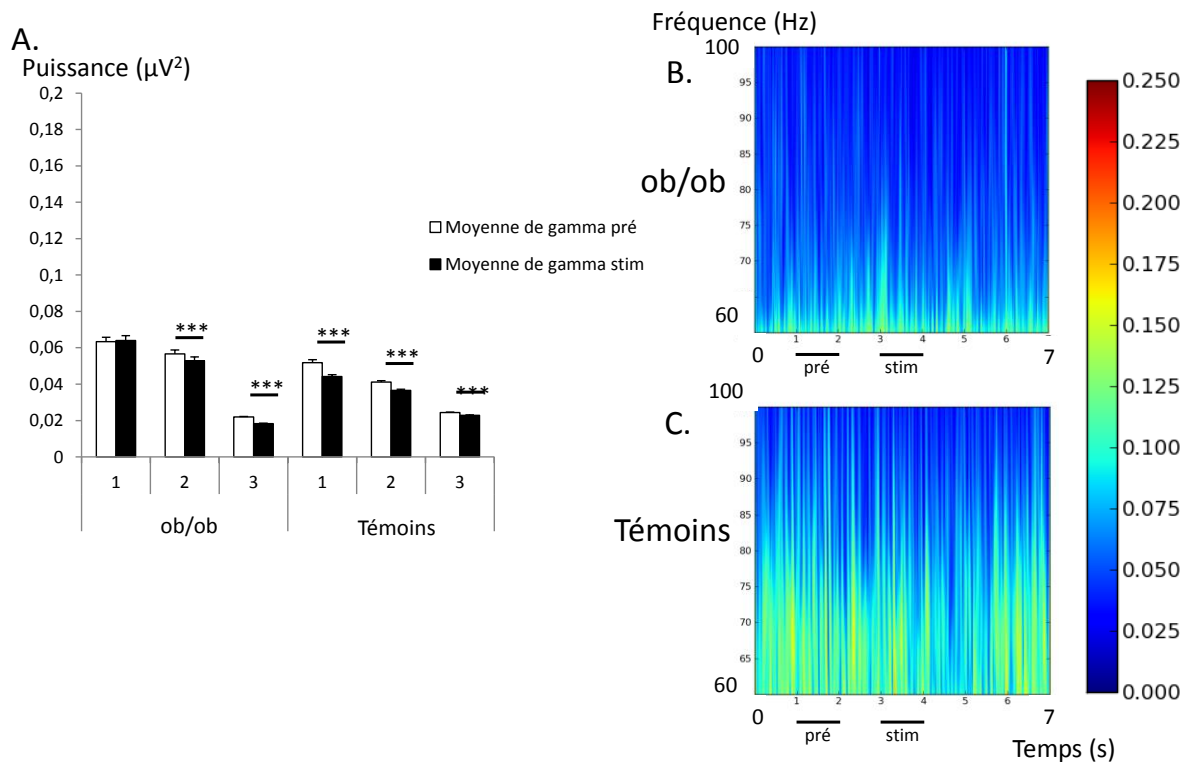


Figure 3.36 : Moyenne de la puissance des pavés temps-fréquence des oscillations gamma par groupe et par Go/NoGo (Débutants). A : Moyenne de puissance des pavés temps-fréquence de la bande gamma de tous les animaux au stade débutants, c'est-à-dire au 1er et au 2ème jour de l'apprentissage, classés de 1 à 3 par expérience et par groupe, ob/ob ou témoins. En blanc, les histogrammes représentent le signal enregistré pendant la période « pré » en l'absence d'odeur. En noir, les histogrammes représentent le signal enregistré pendant la période « stim », en présence d'odeur. B : Carte représentative des pavés temps-fréquence de la bande gamma moyennée sur l'ensemble des 40 essais de la première journée d'apprentissage d'une souris ob/ob du groupe 2. C : Carte représentative des pavés temps-fréquence de la bande gamma moyennée sur l'ensemble des 40 essais de la première journée d'apprentissage d'une souris témoin du groupe 2.

8.3.4 Oscillations gamma (60-100 Hz) chez des animaux experts

Pour finir, nous avons analysé la puissance des oscillations gamma chez des animaux experts. Nous n'avons pas constaté de changement notable avec les conclusions tirées de l'observation des animaux débutants. Le gamma est toujours légèrement plus faible pendant la stimulation, à la fois pour les ob/ob (pré= $0,059 \pm 0,0013 \mu V^2$; stim= $0,053 \pm 0,001 \mu V^2$ pour le groupe 1; pré= $0,067 \pm 0,0022 \mu V^2$; stim= $0,054 \pm 0,0016 \mu V^2$ pour le groupe 2 et pré= $0,024 \pm 0,0012 \mu V^2$; stim= $0,022 \pm 0,001 \mu V^2$ pour le groupe 3, $p < 0.0001$ pour les 3 groupes) et pour les témoins (pré= $0,052 \pm 0,0013 \mu V^2$; stim= $0,05 \pm 0,001 \mu V^2$ pour le groupe 1; pré= $0,08 \pm 0,0013 \mu V^2$; stim= $0,074 \pm 0,0011 \mu V^2$ pour le groupe 2 et pré= $0,024 \pm 0,0003 \mu V^2$; stim= $0,022 \pm 0,0003 \mu V^2$ pour le groupe 3, $p < 0.0001$ pour les 3 groupes). Les seuls remarques que nous pouvons apporter concernent la légère baisse de puissance des oscillations gamma dans le groupe ob/ob par rapport aux animaux débutants ($p < 0.001$), et une légère augmentation du gamma chez les animaux témoins du groupe 2 (ce qui est visible en comparant les images des figures 3.35 B et 3.35 C. Ces résultats ne nous permettent pas de conclure qu'il existe une différence nette dans la réponse oscillatoire de la bande gamma entre les animaux ob/ob et témoins, même après un apprentissage (figure 3.35).

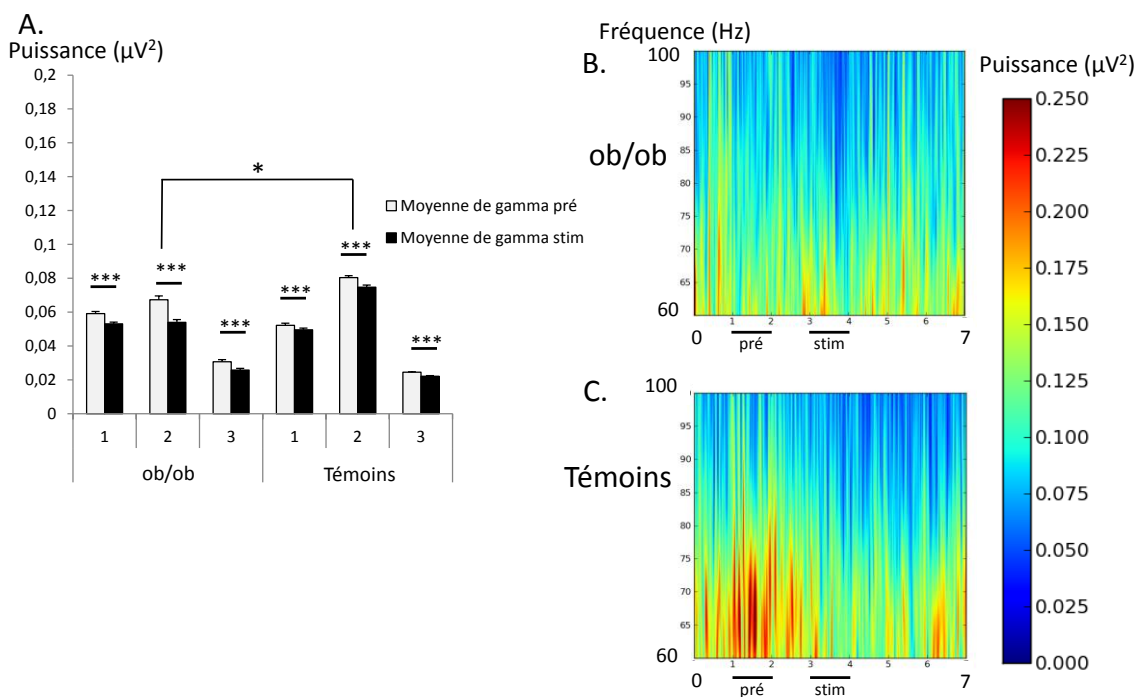


Figure 3.37 Moyenne de la puissance des pavés temps-fréquence des oscillations gamma par groupe et par Go/NoGo (experts). A : Moyenne de puissance des pavés temps-fréquence de la bande gamma de tous les animaux au stade experts, c'est-à-dire aux deux derniers jours de l'apprentissage, classés de 1 à 3 par expérience et par groupe, ob/ob ou témoins. En blanc, les histogrammes représentent le signal enregistré pendant la période « pré » en l'absence d'odeur. En noir, les histogrammes représentent le signal enregistré pendant la période « stim », en présence d'odeur. B : Carte représentative des pavés temps-fréquence de la bande gamma moyennée

sur l'ensemble des 40 essais de la dernière journée d'apprentissage d'une souris ob/ob du groupe 2. C : Carte représentative des pavés temps-fréquence de la bande gamma moyennée sur l'ensemble des 40 essais de la dernière journée d'apprentissage d'une souris témoin du groupe 2.

L'ensemble de ces résultats semble indiquer que la manière dont évolue la puissance des oscillations chez les ob/ob au cours de la tâche de Go/NoGo est similaire à ce qui est décrit dans la littérature : chez des animaux débutants, la puissance des oscillations bêta augmente lors de la présentation d'une odeur, et cette augmentation est plus prononcée lorsque les animaux sont experts. Toutefois, l'absence de leptine semble avoir un impact sur la plasticité olfactive au cours de cette tâche d'apprentissage : alors que nous ne constatons pas de différence significative de la puissance bêta entre animaux témoins et obèses débutants, celle-ci est en revanche bien plus importante chez les ob/ob lorsque les animaux sont experts. Au contraire, les oscillations gamma diminuent légèrement de puissance pendant la présentation d'une odeur, chez les animaux ob/ob comme chez les animaux témoins. Il semble que l'absence de leptine ait également un léger impact sur la plasticité olfactive liée aux oscillations gamma, puisqu'on observe une légère baisse de la puissance de celles-ci chez des animaux obèses experts, mais pas chez des animaux témoins experts (au contraire, la puissance du gamma augmente chez les animaux témoins du groupe 2). Le comportement des animaux (ob/ob et témoins) montre qu'ils distinguent bien l'odeur Go de l'odeur NoGo, mais nous n'avons relevé aucune différence significative entre les deux odeurs en termes d'activité oscillatoire.

9. Résumé des résultats

Comparées à des souris témoins, les souris ob/ob :

- explorent davantage, à l'état nourri, une pâte sucrée odorisée à l'amande (avec lequel elles ont été nourries pendant deux à trois semaines) que la même pâte sucrée sans odeur.
- explorent autant à l'état nourri une odeur d'orange « habituée », c'est-à-dire présentée plusieurs fois par jour sans association à de la nourriture palatable
- présentent une activité locomotrice diminuée au cours d'un cycle jour/nuit de 24h
- ne bougent presque plus à jeun quand on les laisse seules dans leur cage pour tester l'exploration olfactive spontanée
- présentent une hyperactivation bulbaire avec la stimulation de l'odeur alimentaire

- présentent une hypoactivation avec la stimulation de l'odeur neutre
- présentent une forte activation des couches profondes quand elles sont injectées avec de la leptine en condition d'activité spontanée ou induite par une odeur alimentaire
- ont une augmentation de cellules néoformées dans le BO en condition spontanée
- n'ont pas d'inflammation massive dans le BO
- n'ont pas de difficulté pour réaliser une tâche de discrimination olfactive de type Go/NoGo quand la récompense hydrique est sucrée donc palatable
- présentent une forte augmentation de la puissance des oscillations bêta liées à l'apprentissage

La partie 4 consacrée à la discussion reviendra sur tous ces points et critiquera constructivement les données obtenues à la lumière de la littérature sur les interactions olfacto-alimentaires et l'obésité.

Partie 4 : Discussion

Comme nous l'avons vu dès l'introduction, la littérature suggère qu'il existe un lien puissant et bilatéral entre le système olfactif et les systèmes endocriniens en lien avec la balance énergétique. L'étude de ces interactions est relativement récente, et, s'il est largement établi que l'olfaction est modulée durant les cycles alimentaires en réponse à des quantités changeantes de molécules comme la ghréline, les orexines, l'insuline ou la leptine, on ignore encore largement les mécanismes précis de la régulation de la fonction olfactive lors de troubles alimentaires comme l'obésité. Dans ce contexte, je déclinerais la discussion de mes résultats en cinq grandes parties : les choix des modèles et des techniques utilisés (avantages et contraintes) ; l'importance de la nature de l'odeur et de l'état nutritionnel dans les changements comportementaux des souris obèses ; les effets de la leptine sur la représentation spatiale puis temporelle des odeurs dans le BO ; et, enfin, un schéma de travail présentant les sites d'action potentiels de la leptine dans le BO, en insistant sur l'importance des fibres centrifuges.

1. Choix des modèles et des techniques d'étude des interactions olfacto-alimentaires

1.1 Modèles murins

Les modèles murins sont très utilisés dans le cadre des études sur l'obésité. Les qualités de ce type de modèles sont régulièrement citées dans la littérature et incluent notamment un coût d'utilisation réduit, des cycles de reproduction et de gestation relativement courts, la possibilité de modifier leur génome, ainsi que le contrôle des facteurs environnementaux (Kanasaki and Koya, 2011; Lutz and Woods, 2012; Nilsson et al., 2012; Yazdi et al., 2015). De plus, les mécanismes du contrôle central de la prise alimentaire présentent des propriétés largement partagés par les différentes espèces de mammifères, qu'il s'agisse des hormones circulantes, des circuits de contrôle de l'état métabolique de l'organisme par l'hypothalamus et des neuropeptides synthétisés (Woods et al., 1998; Schwartz et al., 1999, 2000; Woods, 2005; Woods and D'Alessio, 2008; Luquet and Magnan, 2009). Toutefois, il existe également certaines limitations chez les modèles de souris, notamment lorsqu'il s'agit de confronter les données obtenues à celles relevées chez l'Homme. Par exemple, les phénotypes décrits peuvent différer : chez l'Homme, la mesure de l'Indice de Masse Corporelle (IMC) est régulièrement utilisé pour caractériser l'obésité alors que chez les modèles murins il n'y a pas de seuil défini pour l'IMC et c'est une mesure directe de la masse grasseuse qui prévaut. Chez la souris, les complications secondaires liées à l'obésité sont souvent liées au fond génétique de la souche utilisée ce qui les distingue de l'être humain (Clee and Attie, 2007). Enfin, malgré de grandes similitudes, il existe des différences physiologiques entre métabolisme humain et murin, rendant l'étude de certains gènes

complexes : je n'ai pas évoqué la β -MSH dans ce manuscrit dont le rôle dans le contrôle de la balance énergétique humaine a longtemps été ignoré du fait de son absence chez la souris (Lee et al., 2006).

Souris ob/ob

Les souris ob/ob sont hyperphagiques dès la naissance et deviennent rapidement obèses. Elles constituent un des premiers modèles animaux d'obésité décrit dans la littérature (Coleman, 1978; Garthwaite et al., 1980; Friedman et al., 1991; Ingalls et al., 1996). Ce modèle, déficient en leptine, nous a permis d'aborder la régulation encore mal connue de l'activité bulbaire par cette hormone. De plus, étant donné que c'est un modèle dont les performances olfactives ont été peu étudiées dans la littérature par rapport au modèle DIO dont l'étude est très avancée dans le laboratoire de Debrah Fadool par exemple (Thiebaud et al., 2014). De fait, les ob/ob nous ont paru pertinentes pour détecter d'éventuels troubles de l'olfaction dans un contexte d'obésité et tester l'action de la leptine pour vérifier si son rôle important dans la régulation de l'homéostasie énergétique s'applique également au niveau des performances olfactives et de l'activité spatiotemporelle dans le BO. Il est à noter qu'à l'âge où nous avons étudié ces souris, nous n'avons pas observé de problèmes de régulation de la glycémie (voir p135). C'est un fait important sachant que les MC sont glucosensibles (Fadool et al., 2011). Nous pouvons conclure que les effets que nous avons observés suite à des injections de leptine sont directement liés à celle-ci et non pas à une variation chronique de glycémie.

Souris DIO

Les cas d'obésité d'origine monogénique induisant une déficience en leptine n'est que très rarement constatée chez l'Homme. Dans ce cadre, les ob/ob ne permettent pas de prendre en compte les mécanismes plurifactoriels à l'origine de l'obésité, notamment la qualité de la nourriture ingérée sans le déclenchement d'une hyperphagie. Les DIO reflètent mieux les cas d'obésité observés chez l'Homme. L'obésité y est d'origine plurifactorielle (pas seulement dépendant de la leptine), c'est-à-dire polygénétique et/ou lié aux facteurs superficiels comme l'alimentation hypercalorique. Différentes souches de souris répondent différemment aux régimes gras HFD. Les souris C57BL/6J, que j'ai utilisées pendant ma thèse, sont très prisées pour les études DIO puisqu'elles développent un phénotype obèse similaire au syndrome métabolique humain (prise de poids, augmentation de la graisse abdominale, hyperinsulinémie, hyperglycémie) lorsqu'elles sont nourries avec un régime HFD (Collins et al., 2004).

Par ailleurs, les souris ob/ob utilisées dans ma thèse possèdent également un fond génétique C57BL/6J : cela nous a permis de disposer de deux modèles différents d'obésité tout en limitant au maximum les différences génétiques entre les groupes.

1.2. Choix de l'anesthésie et de la technique d'imagerie neurofonctionnelle

Au début de cette thèse, afin d'étudier la plasticité de la représentation spatiotemporelle chez les souris obèses ob/ob, nous devions les anesthésier dans deux contextes : l'imagerie optique et l'implantation des électrodes à demeure. Romain Chery, doctorant ayant réalisé sa thèse au laboratoire IMNC avant moi, a conduit de nombreux essais pharmacologiques afin de déterminer le mélange le plus adapté au maintien de l'anesthésie et au réveil des animaux dans ces deux types d'expériences (Chery et al., 2014). Il a opté pour un mélange injecté en intraperitonéale (i.p) que j'ai utilisé au début de mes expériences : 0.1 mL / 10g d'une solution de kétamine (75mg/kg) et de médétomidine (0,425 mg/kg). A la fin de l'implantation, une injection i.p d'atipémazole (Antisedan®, Janssen, France), un antagoniste des récepteurs adrénergiques avec un effet anti-médétomidine, permet un meilleur réveil.

Comme je l'ai précisé dans le chapitre II, ce mélange était parfaitement adapté aux animaux témoins, chez lesquels je n'ai obtenu aucune perte, mais il a malheureusement induit un très fort taux de mortalité chez les animaux obèses ob/ob. Good (2005) indique qu'il n'existe malheureusement pas d'étude pharmacologique comparant de façon exhaustive l'effet de différents anesthésiques sur les animaux obèses. Cependant, il indique que l'accumulation excessive de masse grasseuse chez les animaux obèses affecte la cinétique des produits anesthésiques et peut causer des problèmes cardiopulmonaires. La solubilité des anesthésiques dans la graisse est également un facteur à prendre en compte : les barbituriques (comme le pentobarbital) ou les stupéfiants (les cyclohexamines comme la kétamine) sont très lipophiles et entraînent souvent des difficultés de réveil, voire la mort des animaux avec une masse grasseuse importante. Ceci est dû non seulement à l'absorption et le stockage des anesthésiques par les graisses, mais également au métabolisme ralenti de l'animal (Kohn, 1997) et à l'altération des fonctions hépatiques et respiratoires (hypoventilation et hypoxie). J'ai moi-même observé que chez les animaux obèses, le mélange kétamine et médétomidine entraînait une mauvaise induction de la sédation et que les animaux continuaient à présenter des réflexes plusieurs dizaines de minutes après l'injection.

Pour résoudre ce problème d'anesthésie, j'ai utilisé l'isoflurane, un produit anesthésiant gazeux qui est insoluble à la fois dans le sang et la graisse (Kohn 1997). Ce gaz est absorbé et éliminé uniquement par voie pulmonaire, ce qui permet une induction de l'anesthésie et un réveil très rapide. En outre, il permet le maintien d'une anesthésie constante tout au long de la chirurgie, contrairement aux anesthésiques injectables dont des doses complémentaires doivent être injectées à intervalle régulier (Gargiulo et al., 2012). L'isoflurane n'engendre que peu d'effets secondaires sur les systèmes cardiovasculaires et respiratoires. J'ai donc adapté mon dispositif expérimental pour maintenir les souris ob/ob correctement anesthésiées pour le MEMRI et l'implantation des électrodes.

Il est important pour moi d'insister sur l'anesthésie puisque le choix de la technique d'imagerie utilisée pour étudier la distribution spatiale de l'activité chez les ob/ob en a en partie découlé. L'IOSI, technique d'imagerie décrite dans le chapitre II et par laquelle j'ai débuté mon étude du BO chez les animaux ob/ob, a été particulièrement développée au laboratoire IMNC. Cette technique a l'avantage de présenter une très bonne résolution spatiale, meilleure que pour le 2DG et le BOLD, puisqu'elle permet de distinguer des glomérules individuels (Pain et al., 2011). En outre, l'animal étant stimulé en temps réel, il est facile de comparer les cartes spatiales induites par plusieurs odeurs et/ou plusieurs concentrations. Or je ne pouvais opter pour l'isoflurane, un gaz odorant, dans le cadre de l'IOSI. Par ailleurs, le signal obtenu par IOSI dépend en partie de l'oxygénation de l'hémoglobine et du volume sanguin présent dans la structure cible (Pain et al., 2011). Or il a été montré que l'isoflurane diminue l'activité vasculaire, et son utilisation de façon optimale en IOSI ou IRMf-BOLD est toujours sujette à discussion (Masamoto et al., 2007; Williams et al., 2010). Enfin, malgré sa résolution, l'IOSI ne permet que de visualiser l'activité de la face dorsale du BO, et uniquement après une stimulation odorante, sans qu'il soit possible de visualiser l'activité spontanée du BO.

Notre choix s'est donc porté sur le MEMRI, une technique de neuroimagerie qui permet de s'affranchir de plusieurs des contraintes citées dans le contexte de l'étude des ob/ob : malgré sa résolution spatiale plus faible, qui ne permet pas de visualiser l'activité induite par des odeurs au niveau de glomérule individuel (Chuang et al., 2010a), le signal enregistré en MEMRI ne dépend pas des propriétés hémodynamiques des tissus mais reflète directement l'activité neuronale de la zone étudiée. De plus, l'isoflurane est l'anesthésique classique utilisé lors des études MEMRI (Pautler, 2004; Koretsky, 2012; Silva, 2012). La stimulation olfactive des animaux et l'acquisition des images sont réalisées de manière décalée dans le temps : l'animal reçoit une injection de manganèse, il est ensuite stimulé avec une odeur, anesthésié, puis placé dans l'aimant pour réaliser l'imagerie. Il s'agit donc d'une acquisition rétrospective, comme pour l'imagerie autoradiographique du 2DG, permettant de visualiser une activité spontanée ou induite par une odeur chez un animal vigile libre de ses mouvements, non affectée par l'anesthésique, et sur l'ensemble du BO. En revanche, l'accumulation de manganèse dans les neurones empêche de présenter différents stimuli à l'animal, de varier les concentrations testées ou encore d'utiliser une souris comme son propre témoin, du moins à court terme. Ceci est particulièrement vrai pour les animaux ob/ob : malgré les qualités de l'isoflurane, il est difficile d'imager ces animaux sur des périodes de plus de 3h pour suivre la dynamique d'accumulation du manganèse, au risque d'entraîner des complications cardiovasculaires. A plus long terme, il paraît peu judicieux d'attendre que le manganèse accumulé disparaisse pour refaire une imagerie MEMRI, puisque le métabolisme énergétique des ob/ob est très affecté, et entraîne des complications pratiques (les animaux ne peuvent plus être maintenus dans la même position dans l'aimant, voire ne peuvent plus y entrer à cause de leur rondeur) et des complications physiologiques :

le phénotype obèse évoluant très vite chez les ob/ob, une seconde imagerie serait faite dans des conditions physiologiques très différentes de la première.

Malgré une résolution spatiotemporelle plus faible qu'en imagerie optique, le MEMRI était donc le bon choix technique pour enregistrer les cartes de distribution spatiale de l'activité dans le BO et surtout de procéder par SPM à la comparaison statistique intra et intergroupe de cette distribution.

1.3. Injection de la leptine

Physiologiquement la leptine est synthétisée et libérée par les adipocytes et agit sur l'ensemble des organes. Elle agit notamment sur l'ensemble des structures cérébrales exprimant des récepteurs leptinergiques donc en amont (MO), en aval (cortex olfactif et centres neuromodulateurs) et à l'intérieur du BO. Dans l'hypothalamus, son entrée dans le cerveau se ferait via des tanocytes qui tapissent le troisième ventricule (Balland et al., 2014). De même l'entrée de leptine dans le BO pourrait être favorisée par une barrière hématoenchéphalique lâche (Ueno et al., 1996). Nous avons choisi le mode d'injection de doses physiologiques par i.p. pour plusieurs raisons : i) mimer de façon la plus pertinente possible l'action physiologique de la leptine dans un contexte où nous ne connaissons pas les concentrations locales de leptine dans le BO ii) la grande limitation technique de l'implantation de canule plastique (diamètre élevé) qui n'endommage pas l'hémibulbe de souris (structure aux dimensions très réduites) pour être compatible avec un enregistrement IRM dans l'aimant. Dans le futur, il serait intéressant d'étudier l'action de la leptine en se rapprochant d'une injection locale, par exemple par voie intracérébroventriculaire.

2. Variations du comportement d'exploration en fonction de l'état métabolique, de l'état nutritionnel et de l'odeur présentée

Au début de l'introduction de cette thèse, j'ai insisté sur la définition que l'on pouvait donner d'une odeur alimentaire, odeur apprise dans un contexte où elle est associée de façon répétée à une nourriture palatable. Nous avons décidé d'associer une odeur d'arôme d'amande du commerce à une pâte légèrement sucrée dont nous avons donné une quantité minimale (environ 0.5g par souris) par jour afin de ne pas perturber leur balance énergétique. Les résultats obtenus précédemment à l'IMNC par Mounir Bendahmane chez le rat (nourri et à jeun) et nos propres données chez la souris indiquent qu'après plusieurs présentations, les animaux associent clairement l'odeur d'amande avec de la nourriture. Dans nos résultats, nous avons trouvé une nette augmentation de l'exploration de la pâte

odorisée par rapport à une pâte non odorisée chez les souris obèses ob/ob et DIO nourries, indiquant qu'il n'y a pas de phénomène de satiété sensorielle chez ces animaux, qui explorent même après un repas (figures 3.4 et 3.5). Ces temps d'exploration sont également supérieurs à ceux des souris témoins de chaque type de souris obèse. Nos résultats concordent avec ce qui a été décrit dans la littérature, notamment chez les ob/ob, qui trouvent plus rapidement de la nourriture odorisée cachée, nourriture à laquelle elles ont été habituées pendant plusieurs jours, par rapport à des souris témoins utilisées dans les mêmes conditions d'habitation et de test (Getchell et al., 2006b).

Toutefois, à jeun (17 heures), nous avons observé des différences comportementales importantes selon le groupe considéré : si les DIO exploraient l'odeur d'amande significativement plus longtemps à l'état nourri, ce n'était en revanche pas le cas chez les ob/ob qui restaient immobiles dans la cage test. Les témoins augmentaient également leur temps d'exploration de l'odeur d'amande à jeun, sans toutefois atteindre un degré significatif chez les témoins DIO, malgré une forte tendance. Si les résultats obtenus lors de nos expériences dans l'actimètre confirment une mobilité significativement diminuée chez les animaux obèses (DIO et ob/ob), il m'est difficile d'expliquer l'absence de mobilité spécifique des ob/ob à jeun en comportement spontané, à part peut-être en évoquant un manque de motivation encore plus sévère que celle que nous avons constatée clairement dans la tâche de discrimination olfactive si elle était effectuée avec une récompense hydrique seule, sans l'apport d'une récompense palatable sucré (figure 3.28). A jeun, la littérature indique un comportement des rongeurs, même des modèles obèses, anticipant la prise alimentaire et induisant la recherche de nourriture, ce que nous avons observé chez les DIO, mais pas chez les ob/ob. De façon intéressante, chez le rat, un antagoniste de la leptine induit la diminution de l'activité locomotrice volontaire dans une roue d'exercice (Matheny et al., 2009). Ces données indiquent que la leptine peut impacter la mobilité générale des animaux et pourrait expliquer en partie nos observations sur l'activité d'exploration spontanée des ob/ob à jeun.

Il convient de préciser toutefois que lors de notre tâche comportementale opérante Go/NoGo, nous n'avons pas relevé de différence de mobilité particulière entre animaux ob/ob et témoins : d'une part, les expériences ont été réalisées chez des animaux ayant un accès ad libitum à la nourriture mais restreints en eau, et d'autre part, il semblerait qu'une tâche de comportement opérant ne soit pas affectée par ce manque de mobilité. Il semble que les animaux obèses engagés dans une tâche d'apprentissage avec récompense ne soient pas affectés par les problèmes moteurs que nous avons constatés dans leur exploration spontanée. Chez le rat obèse Zucker fa/fa, chez lequel le récepteur ob-R à la leptine est déficient, une tâche aversive d'odeur conditionnée montre que les animaux obèses perçoivent plus aisément les odeurs à la fois par rapport à des animaux témoins et lorsqu'ils sont à jeun, sans qu'un impact sur la mobilité soit signalé (Aimé et al., 2014). De façon intéressante, une autre étude sur le rat obèse Zucker montre que des animaux obèses de 4 mois nourris ad libitum

augmentent significativement leur activité d'échantillonnage et de recherche de nourriture dans une tâche de « nose-poke » (dans laquelle les animaux utilisent des indices olfactifs pour détecter la source odorante) face à des animaux témoins, mais uniquement lorsqu'ils ont été familiarisés avec l'odeur auparavant, dans ce cas du bacon, aliment très énergétique. En revanche, des animaux de 12 mois nourris *ad libitum* ou restreints, augmentent leur activité d'échantillonnage pour une odeur neutre ou familière. Il existe par ailleurs chez ces animaux une corrélation entre prise alimentaire, prise de poids, et augmentation de l'activité d'échantillonnage. Il s'agit à ma connaissance de la seule étude montrant une augmentation de l'activité liée à la recherche de nourriture chez des modèles obèses, en réponse à une odeur neutre. Ces données suggèrent par ailleurs que la leptine ait un rôle différent selon l'âge des animaux, ici 4 et 12 mois, mais aussi selon leur régime alimentaire (Thanos et al., 2013). Ces données sont accord avec ce que nous avons observé au cours des tâches d'exploration pour l'odeur d'orange neutre puisque par rapport à des souris témoins, des souris obèses jeunes (DIO et *ob/ob*) n'explorent pas plus cette odeur, qu'elles ont rencontré plusieurs fois avant le jour test mais sans qu'elle ne soit associée à la nourriture (figures 3.6 et 3.7). On comprend ici toute l'importance de l'apprentissage de l'association entre odeur et nourriture palatable dans la mémorisation et la valence d'une odeur qui devient de fait alimentaire, surtout dans le contexte d'un organisme obèse, dont la balance énergétique est dérégulée et pousse l'individu à exprimer un comportement hyperphagique et de fait, rechercher constamment de la nourriture. Dans ce cadre, nous pensons que les données que nous avons obtenues ne sont pas spécifiques de l'arôme d'amande en tant qu'odeur alimentaire : n'importe quelle odeur, pourvue qu'elle ne soit pas aversive naturellement, peut devenir une odeur alimentaire si elle est associée de façon répétée à une nourriture palatable, et avoir une valence très forte pour les souris *ob/ob*.

3. Implication de la leptine dans la distribution spatiale de l'activité dans le BO

Avant de discuter les résultats d'imagerie MEMRI analysés par SPM, je voudrais faire un rappel des différentes comparaisons statistiques effectuées, en présentant à nouveau le tableau 3.1.





	N=5 Pour chaque groupe	Témoins	Ob/Ob	Témoins	Ob/Ob	Ob/Ob + leptine	Ob/Ob + leptine	Témoins	Ob/Ob
		Air	Air	Amande 5%	Amande 5%	Air	Amande 5%	Pentyl acétate 5%	Pentyl acétate 5%
	Témoins Air		Test 2 inv	Test 1 inv				Test 8 inv	
	Ob/Ob Air	Test 2			Test 4 inv	Test 5 inv			Test 9 inv
	Témoins Amande 5%	Test 1			Test 3 inv		Test 7 inv		
	Ob/Ob Amande 5%		Test 4	Test 3			Test 6 inv		
	Ob/Ob + leptine Air		Test 5						
	Ob/Ob + leptine Amande 5%			Test 7	Test 6				
	Témoins Pentyl acétate 5%	Test 8							Test 10
	Ob/Ob Pentyl acétate 5%		Test 9					Test 10 inv	

Tableau 3.1. Récapitulatif des différents tests réalisés avec SPM. Une seule tranche issue de la partie médiale de l'axe antéropostérieur est montrée pour chaque test. Les images montrent les voxels qui sont statistiquement supérieurs dans le groupe de la colonne de gauche comparé au groupe de la 1ère ligne. Une absence de pixels colorés montre une absence de différence entre les deux groupes comparés dans le sens indiqué.

La discussion MEMRI/SPM se fera suivant trois axes : a) l'augmentation d'activité suite à la présentation d'une odeur alimentaire chez les ob/ob ; b) l'impact de la leptine sur l'activité du BO en activité spontanée ou suite à la présentation d'une odeur alimentaire ; c) la diminution de l'activité suite à la présentation d'une odeur non rencontrée au préalable chez les ob/ob.

a) Dans le cadre d'une activité spontanée sans stimulation olfactive, nous n'observons pas de différence majeure entre animaux ob/ob et animaux témoins (test 2 figure 3.14). Lors de la présentation d'odeur d'amande, l'activation du BO est plus importante chez les animaux ob/ob que chez les témoins, en particulier dans les couches superficielles latérales, médiales et dorsales du BO

(GL, EPL) et débordent vers les couches profondes (MCL, GCL) (test 3 figure 3.15). En comparant l'activité des ob/ob stimulées avec une odeur d'amande aux ob/ob stimulées avec de l'air, la stimulation olfactive engendre bien une activation de la GL latérale qui semble spécifique de l'odeur d'amande. Toutefois, par rapport à des animaux témoins, les animaux obèses stimulés avec de l'amande présentent une activation bien plus importante de la GL, ventralement, dorsalement, et sur un axe rostro-caudal plus étendu (test 4 figure 3.16). Il reste néanmoins à préciser chez les ob/ob si l'odeur d'amande apprise induite ou non une augmentation d'activité par rapport à une odeur d'amande inconnue.

b) L'injection de leptine impacte fortement l'activité spatiale. Suite à l'injection et en activité spontanée, les ob/ob ayant reçu la leptine présente une plus forte activation au niveau des couches profondes de la partie dorsale du BO (GCL notamment) (figure 3.17, test 5). En contrepartie, le test 5 inverse (ob/ob air > ob/ob air + leptine) (figure 3.18), qui permet de visualiser les zones non activées dans le test 5, nous permet d'affirmer que chez le groupe ayant reçu la leptine, l'activation des couches superficielles en activité spontanée est plus faible. En outre, ce même test 5 inverse met en évidence les zones de la couche superficielle dont l'activation (ou plutôt l'augmentation d'activation par rapport à des souris témoins) est uniquement dépendante de la leptine, avec comme constaté dans le test 2 (ob/ob air > témoins air), une très forte activation de la GL qui est spécifiquement suractivée chez les souris ob/ob déficientes en leptine.

Ce schéma d'activation est similaire après une stimulation avec de l'amande. Suite à l'injection de leptine, le groupe stimulé avec l'odeur d'amande montre une plus forte activation au niveau des couches profondes du BO, une activation qui est également plus étendue (figure 3.19 test 6). Le test 6 inverse (ob/ob amande 5% > ob/ob amande 5% + leptine) (figure 3.20) montre de nouveau une activation plus faible des couches latérales, mais moins étendue qu'en activité spontanée. En cas de présentation d'une odeur, la leptine semble donc impacter de manière plus large les couches profondes et de manière plus restreinte les couches superficielles qu'en activité spontanée.

Ces données nous indiquent que l'action de la leptine n'est pas spécifique de la présentation d'une odeur alimentaire chez les ob/ob. Elle semble avoir une action similaire, indépendamment du fait que l'animal soit stimulé par de l'air ou par une odeur alimentaire. D'après nos résultats, la leptine régule l'activité bulbaire de façon plus fine et non homogène sur l'ensemble du BO et entraîne une activation des couches profondes et une inhibition des couches superficielles, comme pour bloquer les entrées sensorielles des OSN et activer davantage la sortie par une action directe sur la boucle MC/GC ou une action indirecte sur les fibres centrifuges. L'action de la leptine n'est donc pas globalement inhibitrice comme reportée en électrophysiologie dans la MO (Savigner et al., 2009). En revanche, chez le rat normal et à jeun, la leptine augmente bien l'activité c-fos en activité spontanée, mais induit une

diminution de l'activité c-fos liée à la stimulation avec une odeur alimentaire (Prud'Homme et al., 2009) : nous n'avons pas observé cet effet inhibiteur chez les souris ob/ob où les couches profondes sont activées et encore davantage activées par la leptine. En faisant très attention à la comparaison rat / souris, état à jeun (baisse de leptine aigüe) / état obèse (absence chronique de leptine) et à la technique utilisée (c-fos vs MEMRI), nous pouvons quand même nous interroger sur la question d'une perte de l'inhibition dans les couches profondes du BO chez les ob/ob.

Enfin, si l'activation induite par l'odeur d'amande chez des ob/ob comparée à des témoins est différente en présence de leptine, car située non plus latéralement mais dans les couches profondes et les couches superficielles médiales, latérales et dorsales, elle reste néanmoins supérieure en intensité chez les ob/ob (figure 3.21 test 7) : de fait, l'injection de leptine ne restaure pas une activité chez les ob/ob qui soit équivalente aux témoins.

c) La présentation d'une odeur neutre de pentylacétate induit une très forte activité chez les souris témoins par rapport à l'activité spontanée, dans tous les couches du BO. Toutefois, chez les ob/ob, la stimulation au pentylacétate ne permet de voir qu'une activation des couches profondes (test 9 figure 3.23), confirmant de fait notre observation lors du test 4 (figure 3.16), selon laquelle la forte activité spontanée observée chez les ob/ob ne permet pas de distinguer l'activité latérale après une stimulation lors d'une comparaison intergroupe. Il est très intéressant de noter que lors de la présentation d'une odeur neutre, ce sont les témoins qui présentent une activation du BO plus importante, dans les couches dorsales superficielles du BO postérieur, et dans les couches latérales superficielles du BO antérieur (Test 10 figure 3.24). Malgré une augmentation de l'activité spontanée, et une activité induite par une odeur d'amande plus importante, la signification de l'odeur pour l'animal semble également jouer un rôle important dans l'établissement de la distribution de l'activité spatiale.

Il est intéressant de confronter ces données avec certains articles où les capacités olfactives de rongeurs ayant une obésité d'origine monogénique semblent être meilleures que celles d'animaux témoins, mais uniquement lorsque les odeurs ont acquis une signification pour l'animal, que ce soit après apprentissage chez le rat Zucker (Aimé et al., 2014), ou après association à de la nourriture chez la souris ob/ob (Getchell et al., 2006a; Thanos et al., 2013).

Dans le paragraphe suivant, je décrirai brièvement les modifications des oscillations au cours de l'apprentissage d'une tâche olfactive de Go/No Go chez les animaux obèses. J'expliquerai ensuite les mécanismes potentiels qui expliquent cette régulation de la dynamique temporelle par la leptine et en quoi ces données sont concordantes avec une partie de mes résultats d'imagerie. Enfin je proposerai un schéma de travail qui résume les hypothèses que je détaillerai concernant les mécanismes et les circuits dans lesquels la leptine pourrait être impliquée dans le cadre de la modulation bulbaire.

4. Plasticité de la représentation temporelle des odeurs chez les souris obèses suite à un apprentissage

Comportementalement, nous n'avons pas observé de différences significatives entre nos souris ob/ob et témoins, qui ont toutes correctement discriminé les odeurs à l'issue de la tâche de Go/No Go. Lorsque les animaux étaient à l'état débutant, nous n'avons pas constaté de différence dans la puissance des réponses oscillatoires, et leur évolution correspondait à ce qui est décrit dans la littérature : pendant la présentation d'une odeur, la puissance des oscillations bêta augmente par rapport à la ligne de base, tandis que le gamma diminue légèrement (Gray and Skinner, 1988a; Martin et al., 2004a; Lowry and Kay, 2007; Lepousez and Lledo, 2013; Chery et al., 2014) . Au cours de l'apprentissage dans le cadre de cette tâche spécifique, dès le moment où les odeurs acquièrent une signification comportementale pour l'animal, l'amplitude des oscillations bêta augmente progressivement lors de l'échantillonnage de l'odeur (Ravel et al., 2003; Martin et al., 2004), tandis que la réponse gamma diminue de façon prononcée (Ravel et al., 2003; Martin et al., 2004a, 2006; Gourévitch et al., 2010; Lepousez and Lledo, 2013). Toutefois, la particularité de notre étude a été d'enregistrer ces activités et la plasticité des réponses oscillatoires bêta chez les animaux ob/ob : lorsque ces derniers sont experts, l'augmentation de l'activité bêta liée à la présentation de l'odeur est beaucoup plus importante que chez les animaux témoins. Comme relevé dans la littérature, parallèlement à cela, les oscillations gamma diminuent.

D'après l'hypothèse proposée par (Engel and Fries, 2010) et développée par (Martin and Ravel, 2014), le bêta et le gamma sont des mécanismes distincts intervenants à différentes étapes du processus d'apprentissage. Les oscillations bêta seraient nécessaires pour la synchronisation d'un large réseau de structures corticales et contribueraient ainsi à la construction de la mémoire olfactive. Cette coordination des oscillations permettrait de marquer préférentiellement le circuit cérébral qu'il serait nécessaire de renforcer pour une réactivation rapide et efficace lors d'une présentation ultérieure du stimulus olfactif. La puissance des oscillations bêta dans le BO est sous la dépendance des retours centrifuges (Martin et al., 2006). Par conséquent, on peut faire l'hypothèse que l'augmentation de la puissance des oscillations bêta observée chez les ob/ob en l'absence de régulation par la leptine, qui n'intervient que lorsque les animaux sont experts, implique très probablement une perturbation au sein de ce réseau entre BO et structures corticales et neuromodulatrices, et une modification de l'activité des retours centrifuges par la leptine. Toutefois, l'ensemble de nos résultats laisse penser que la leptine aurait aussi un impact localement dans le BO, comme nous allons le discuter dans le paragraphe suivant. Si nous pouvons discuter de l'origine de cette modulation de l'activité bêta chez les souris ob/ob, il paraît en revanche plus difficile d'interpréter l'impact fonctionnel de cette hausse. En effet,

nous n'avons pas distingué de différences comportementales dans l'acquisition de cette tâche de Go/No Go. A ma connaissance, dans le cadre de tâches de discrimination olfactive, il n'existe pas chez les rongeurs d'expériences où une augmentation de la puissance des oscillations bêta a été induite et a eu un impact comportemental clairement défini. Il n'y a pas de relation linéaire entre puissance des oscillations bêta et capacités mnésiques. Cependant une étude plus fine de nos données comportementales pourrait révéler des différences entre les ob/ob et les témoins. Deux études ont montré une corrélation entre la puissance des oscillations évoquées par l'odeur et le comportement, mais il s'agissait d'oscillations gamma. En effet, la perturbation spécifique des récepteurs GABA-A localisés sur les cellules granulaires (qui sont celles qui reçoivent les entrées centrifuges) induit une augmentation de l'activité gamma dans le BO. Or ces souris présentent également de meilleures performances d'identification d'odeurs, mais une altération de la capacité à discriminer des mélanges d'odorants (Nusser et al., 2001). D'autre part, (Beshel et al., 2007) ont montré dans une tâche de discrimination olfactive chez le rat, non pas dans un test de Go/No Go mais de double choix alternatif, qu'une discrimination difficile (liée à la similarité moléculaire des odorants) entraînait une forte augmentation de gamma pendant l'échantillonnage de l'odeur, qui n'est pas observée pour une discrimination plus facile. L'inhibition des retours centrifuges, qui abolit les oscillations bêta provoque également une augmentation de la puissance des oscillations gamma (Martin et al., 2006). Dans le cadre de l'étude de l'altération des activités oscillatoires dans la maladie de Parkinson, l'augmentation de la puissance des oscillations induit une détérioration de la flexibilité comportementale, c'est-à-dire une perte de la capacité à s'adapter à un changement de stimulus dans la tâche comportementale (Engel and Fries, 2010). En partant de cette constatation, il serait intéressant de défier les souris ob/ob dans des tâches olfactives plus complexes ou qui nécessitent une flexibilité, comme dans le cadre d'un changement de paires d'odeurs ou d'inversion des valences. Dans ce contexte, les ob/ob avec de fortes oscillations bêta pourraient avoir du mal à s'adapter. Si tel est le cas, il serait de fait nécessaire d'évaluer les dynamiques oscillatoires dans un réseau plus large de structures, incluant le cortex piriforme et l'hippocampe impliqués dans ce traitement (Gourévitch et al., 2010), et qui présentent eux aussi une forte densité de récepteurs à la leptine (Irving and Harvey, 2014). Un complément d'étude intéressant pourrait également être la réalisation d'une tâche de Go/No Go avec injections chroniques de leptine.

5. Leptine, obésité et régulation de mécanismes olfactifs

Je voudrais maintenant proposer mes hypothèses de travail sur le rôle de la leptine dans la représentation spatiotemporelle des odeurs au sein du BO.

Plusieurs études effectuées *in vitro* sur tranches de BO ont essayé de déterminer le rôle des peptides, signaux du statut nutritionnel, comme les orexines et insuline, sur les interactions entre les MC et GC. Les récepteurs aux orexines sont localisés sur les corps cellulaires des GC et MC et dans les synapses réciproques entre les deux types cellulaires (Hardy et al., 2005). Des études suggèrent que les orexines ont un effet hyperpolarisateur indirect sur les MC, par des transmissions dépendantes de la dépolarisation des GC qui en retour inhibent les MC (Hardy et al., 2005). La présence de l'insuline, hormone anorexigène et son action dans la MO et le BO, et notamment son impact sur l'excitabilité des cellules mitrales via la modulation des canaux potassiques Kv1.3 ont été bien décrits (Fadool et al., 2000, 2011; Lacroix et al., 2008; Marks et al., 2009; Savigner et al., 2009). Récemment, des expériences effectuées sur des tranches de BO ont montré que i) les MC sont sensibles à la variation des concentrations de glucose, autrement dit, ce sont des cellules glucosensibles (Fadool et al., 2011) ; ii) l'insuline, hormone anorexigène, augmente non seulement l'excitabilité des MC en inhibant leurs canaux potassiques voltages dépendants, mais réduit également l'activité des projections glutamatergiques et GABAergiques des interneurons sur les MC. L'insuline agirait sur les MC en fonction de l'activité évoquée par les OSN, et diminuerait la variabilité des réponses de la population des MC en fonction de l'état nutritionnel (Kuczewski et al., 2014).

Pour la leptine, bien que ses récepteurs soient détectés dans toutes les couches du BO (Caillol et al., 2003; Prud'homme et al., 2009), aucune étude électrophysiologique n'a pour l'instant été réalisée. Une étude importante réalisée au centre INRA de Jouy a montré qu'une injection intra-cérébro-ventriculaire de leptine 1 heure avant la stimulation olfactive augmentait chez les rats à jeun l'activité c-fos spontanée dans les couches MCL et GCL (mais pas GL) et qu'elle diminuait l'activité de c-fos en réponse à une odeur alimentaire (Prud'homme et al., 2009). Nos résultats sont en accord avec cette étude en étendant l'explication du mode d'action de la leptine au fonctionnement du BO chez des souris obèses. Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'en l'absence totale de signalisation leptinergique, en état de désinhibition, l'activité des projections des OSN vers le BO est plus élevée (Savigner et al., 2009), ce qui expliquerait la forte augmentation de l'activité spontanée chez les souris ob/ob. Toutefois, l'absence de leptine pourrait également impacter l'activité intrabulbaire, et comme nous l'avons constaté dans l'augmentation du nombre de cellules néoformées chez les souris ob/ob : l'augmentation mécanique du nombre de nouveaux neurones (GC et PGC) formés dans le BO pourrait à la fois modifier le nombre de sites d'entrée postsynaptique du manganèse et l'activité de la boucle d'interaction MC/GC. Comme nous l'avons montré en injectant la leptine à des souris ob/ob, l'hormone semble augmenter l'absorption de manganèse par les neurones des couches profondes du BO, tout en diminuant l'absorption des couches superficielles du BO, suggérant une action globalement excitatrice de la leptine sur la couche GCL et MCL et inhibitrice sur la couche GL (directement et/ou par l'intermédiaire de l'inhibition des afférences des OSN). De façon intéressante,

dans notre étude la leptine ne semble pas agir de façon uniforme sur l'ensemble du BO, en stimulant par exemple les couches profondes indépendamment de toute stimulation olfactive (conformément à Prud'Homme et al., 2009), en inhibant les couches latérales en fonction de l'odeur présentée, et en ne semblant pas impacter les couches dorsales superficielles. Cet effet pourrait être lié à une expression différentielle et hétérogène de Ob-R dans le BO, mais très peu d'études, à part celle de Prud'homme et al., (2009) ont pour l'instant décrit l'expression de Ob-R dans le BO, l'immunodétection de Ob-R étant encore un défi technique à l'heure actuelle (communication personnelle de Vincent Prévost, INSERM / Lille). Dans ce contexte, des études de patch clamp pourraient permettre d'étudier précisément l'effet de la leptine sur les différentes populations cellulaires du BO, notamment entre PGC et GC. Cette étude cellulaire menée chez les ob/ob pourrait aussi expliquer pourquoi nous ne retrouvons pas chez la souris ob/ob l'effet inhibiteur de la leptine sur l'activité des couches profondes induite par l'odeur alimentaire visualisée chez le rat à jeun (Prud'homme et al., 2009).

Comment expliquer l'impact spécifique de la leptine sur l'odeur alimentaire, une odeur ayant acquis une signification pour l'animal, et non pas sur l'odeur neutre inconnue ? Comme je l'ai décrit pour les études comportementales, l'ensemble de la littérature décrit une meilleure performance olfactive des animaux uniquement suite à un apprentissage, ou lorsque l'animal a associé la nourriture à un aliment, ce qui est le cas de l'odeur d'amande que nous avons utilisée. Par contre face à une odeur neutre comme l'arôme d'orange pour l'exploration spontanée ou le pentylacétate utilisé pour la stimulation en MEMRI, les animaux ob/ob ne présentaient pas de réponse comportementale ou de signaux MEMRI supérieurs par rapport aux témoins. L'imagerie SPM a même montré que les animaux témoins stimulés avec le pentylacétate présentaient une activité supérieure dans le BO par rapport aux animaux ob/ob. La réponse comportementale et l'activité bulbaire des animaux ob/ob en réponse à la leptine sont donc fortement liées à l'apprentissage. Ces observations sont tout à fait cohérentes avec (i) l'augmentation des oscillations bêta que nous avons observée en électrophysiologie, qui est-elle-même le même marqueur fonctionnel du réseau olfactif fortement lié à l'apprentissage ; (ii) avec la régulation de la maturation des neurones néoformés en période postprandiale.

Pour l'augmentation du bêta en l'absence de leptine chez les ob/ob, il est probable que la leptine ait une action forte sur les projections centrifuges du BO. Dans ce cadre, les ECB et les récepteurs CB1 (Soria-Gomez et al., 2014) peuvent servir d'effecteurs à la signalisation leptinergique sur les fibres centrifuges, de façon similaire à des mécanismes décrits dans l'hypothalamus (Cardinal et al., 2014). Il a été montré qu'une injection locale d'un agoniste des récepteurs CB1 dans le BO induisait chez la souris témoin à jeun une augmentation de la prise alimentaire (Soria-Gomez et al., 2014). Cette augmentation de la prise alimentaire pourrait être due à une diminution de l'habituation aux odeurs alimentaires, c'est-à-dire à un maintien de l'exploration olfactive, qui a été détectée chez ces mêmes

souris injectées. L'interaction leptine-récepteurs CB1 serait spécifique de la GCL puisque dans la GL, même si des OR-b existent, il y a moins de récepteurs CB1 détectés. L'action des CB1 étant de freiner la libération de glutamate par les fibres centrifuges, en l'absence de leptine, les CB1 pourraient être inactifs et « laisser couler » le flux de glutamate pour aboutir à une suractivation des GC. De plus, il n'est pas exclu que les interactions leptine-ECB puissent avoir lieu dans l'AON, le tractus olfactif latéral ou le cortex piriforme (Suárez et al., 2011).

Pour la neurogenèse, il a été montré que, durant le sommeil post-prandial (ou la concentration de leptine est élevée), l'élimination des GC néoformées non intégrées dans le réseau serait effectuée sous l'influence de facteurs encore inconnus mais au nombre desquels on compte les hormones anoréxigènes et l'activité des fibres centrifuges qui sont essentielles à l'insertion fonctionnelle des GC immatures dans le circuit bulbaire (Yamaguchi et al., 2013). L'hypothèse de l'implication de la fonction des retours centrifuges du PC vers le BO a été récemment testé (Komano-Inoue et al., 2014) : en cas d'inhibition de ces retours chez la souris vigile, l'apoptose des GC diminue. Or chez les ob/ob, le flot d'information entrant dans les couches profondes par les centrifuges serait augmenté, ce qui devrait suivant « l'hypothèse centrifuge » augmenter l'apoptose et l'élimination des GC néoformées, ce qui n'est pas cohérent avec nos résultats. Nous pouvons donc penser que la leptine agit sur l'apoptose et la maturation des GC par un mécanisme indépendant des GC, mécanisme qui reste à être décrit et qui serait différent de celui qui a été décrit dans l'hippocampe où la leptine stimule la neurogenèse (Garza et al., 2012).

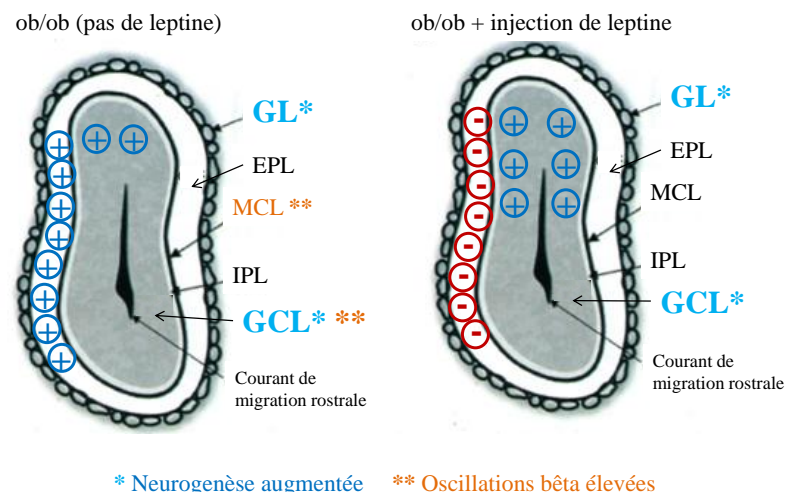


Figure 4.1 Représentation schématique de la variation des signaux MEMRI et de leurs bases cellulaires étudiées pendant la thèse. Les signaux sont représentés en activité spontanée et en réponse à l'odeur alimentaire, chez les souris ob/ob à gauche et chez les souris ob/ob injectée avec de la leptine à droite. La participation de la neurogenèse et des oscillations à ces variations est également indiquée.

Nous postulons suite à l'ensemble de ces résultats que l'absence de leptine chez les ob/ob impacte la représentation spatiotemporelle intrabulbaire des odeurs, uniquement lorsque celles-ci ont

acquis une valeur appétitive après un apprentissage. Cette modulation n'est pas entièrement inhibitrice et régule finement et de façon différentielle l'activité du BO, en inhibant l'entrée des afférences au niveau de la GL et en activant les retours centrifuges au niveau de la GCL. Un mécanisme intéressant à proposer impliquerait un couplage avec les récepteurs CB1 des ECB exprimés sur les retours centrifuges. Il est possible que d'autres structures du cortex olfactif soient modulées par l'action de la leptine ou des ligands des ECB, et en plus de structures non identifiées nous pouvons proposer le PC comme un candidat potentiel puisque il y a une augmentation de l'expression des ARNm des récepteurs à la leptine chez les ob/ob par rapport à des animaux témoins (Huang et al., 1997).

Conclusion

Les interactions olfacto-alimentaires sont étudiées depuis récemment sous l'angle de la pathologie métabolique dévastatrice qu'est l'obésité. Nous avons mené une série d'études in vivo pour comprendre l'influence de l'obésité et de la leptine sur l'activité spontanée et évoquée par une odeur alimentaire et neutre en MEMRI. Nous avons également apporté des données sur la dynamique temporelle du BO chez des souris ob/ob en situation d'apprentissage ainsi que sur la neurogenèse basale. Alors que les études sur les souris DIO montrent une perte de fonction olfactive profonde dans la MO couplée à une baisse des performances olfactives (Thiebaud et al., 2014), nous montrons dans notre étude sur l'autre modèle murin important de l'obésité, les ob/ob, que l'absence de leptine influence fortement la distribution de l'activité spatiale dans le BO, l'activité des boucles MC/GC en situation d'apprentissage ainsi que la neurogenèse basale, vers le sens d'un gain de fonction. En MEMRI, l'injection de leptine montre un effet massif d'activation sur les couches profondes et un effet inhibiteur sur les couches superficielles. Nous pensons que les mécanismes d'apprentissage de l'odeur alimentaire accompagné du recrutement de l'ensemble du réseau olfactif sont essentiels dans l'interaction avec la régulation leptinergique et sont à explorer davantage dans le cadre du modèle ob/ob mais aussi dans le modèle DIO. A l'issue de ce travail de thèse, nous prévoyons la publication de deux articles, l'un concernant la représentation spatiale des odeurs par MEMRI chez les ob/ob, l'autre portant sur l'étude des oscillations chez ces animaux obèses.

Bibliographie

- Abraham N, Spors H, Carleton A, Margrie T, Kuner T, Schaefer A (2004) Maintaining accuracy at the expense of speed: stimulus similarity defines odor discrimination time in mice. *Neuron* 44:865–876.
- Adrian BYED (1942) OLFACTORY REACTIONS IN THE BRAIN OF THE HEDGEHOG. :459–473.
- Ahima RS, Osei SY (2004) Leptin signaling. *Physiol Behav* 81:223–241.
- Aimé P, Duchamp-Viret P, Chaput MA, Savigner A, Mahfouz M, Julliard AK (2007) Fasting increases and satiation decreases olfactory detection for a neutral odor in rats. *Behav Brain Res* 179:258–264.
- Aimé P, Palouzier-Paulignan B, Salem R, Al Koborssy D, Garcia S, Duchamp C, Romestaing C, Julliard a. K (2014) Modulation of olfactory sensitivity and glucose-sensing by the feeding state in obese Zucker rats. *Front Behav Neurosci* 8:1–17 Available at: <http://journal.frontiersin.org/journal/10.3389/fnbeh.2014.00326/full>.
- Al Koborssy D, Palouzier-Paulignan B, Salem R, Thevenet M, Romestaing C, Julliard a. K (2014) Cellular and molecular cues of glucose sensing in the rat olfactory bulb. *Front Neurosci* 8:1–14 Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2014.00333/abstract>.
- Albrecht J, Schreder T, Kleemann AM, Schöpf V, Kopietz R, Anzinger A, Demmel M, Linn J, Kettenmann B, Wiesmann M (2009) Olfactory detection thresholds and pleasantness of a food-related and a non-food odour in hunger and satiety. *Rhinology* 47:160–165 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19593973>.
- ANAND BK, CHHINA GS, SHARMA KN, DUA S, SINGH B (1964) ACTIVITY OF SINGLE NEURONS IN THE HYPOTHALAMIC FEEDING CENTERS: EFFECT OF GLUCOSE. *Am J Physiol* 207:1146–1154.
- Aoki I, Wu Y-JL, Silva AC, Lynch RM, Koretsky AP (2004) In vivo detection of neuroarchitecture in the rodent brain using manganese-enhanced MRI. *Neuroimage* 22:1046–1059 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15219577>.
- Apelbaum a F, Chaput M a (2003) Rats habituated to chronic feeding restriction show a smaller increase in olfactory bulb reactivity compared to newly fasted rats. *Chem Senses* 28:389–395.
- Apelbaum a. F, Perrut a., Chaput M (2005) Orexin A effects on the olfactory bulb spontaneous activity and odor responsiveness in freely breathing rats. *Regul Pept* 129:49–61.
- Ashburner J, Friston KJ (2000) Voxel-based morphometry--the methods. *Neuroimage* 11:805–821 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10860804.
- Aylwin ML, Aguilar G a, Flores FJ, Maldonado PE (2009) Odorant modulation of neuronal activity and local field potential in sensory-deprived olfactory bulb. *Neuroscience* 162:1265–1278.
- Badonnel K, Denis JB, Caillol M, Monnerie R, Piumi F, Potier MC, Salesse R, Baly C (2007) Transcription profile analysis reveals that OBP-1F mRNA is downregulated in the olfactory mucosa following food deprivation. *Chem Senses* 32:697–710.
- Badonnel K, Durieux D, Monnerie R, Grébert D, Salesse R, Caillol M, Baly C (2009) Leptin-sensitive OBP-expressing mucous cells in rat olfactory epithelium: A novel target for olfaction-nutrition crosstalk? *Cell Tissue Res* 338:53–66.
- Balland E, Dam J, Langlet F, Caron E, Steculorum S, Messina A, Rasika S, Falluel-Morel A, Anouar Y, Dehouck B, Trinquet E, Jockers R, Bouret SG, Prévot V (2014) Hypothalamic tanycytes are an ERK-gated conduit for leptin into the brain. *Cell Metab* 19:293–301.
- Baly C, Aioun J, Badonnel K, Lacroix M-C, Durieux D, Schlegel C, Salesse R, Caillol M (2007) Leptin and its receptors are present in the rat olfactory mucosa and modulated by the nutritional status. *Brain Res* 1129:130–141.
- Banks WA (2004) The many lives of leptin. *Peptides* 25:331–338.

- Banks WA, Kastin AJ, Pan W (1999) Uptake and degradation of blood-borne insulin by the olfactory bulb. *Peptides* 20:373–378.
- Barbano MF, Le Saux M, Cador M (2009) Involvement of dopamine and opioids in the motivation to eat: Influence of palatability, homeostatic state, and behavioral paradigms. *Psychopharmacology (Berl)* 203:475–487.
- Barres B a (2008) The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron* 60:430–440.
- Barrios AW, Nunez G, Sanchez Quinteiro P, Salazar I (2014) Anatomy, histochemistry, and immunohistochemistry of the olfactory subsystems in mice. *Front Neuroanat* 8:1–10 Available at: <http://www.frontiersin.org/Neuroanatomy/10.3389/fnana.2014.00063/abstract>.
- Bartos M, Vida I, Jonas P (2007) Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks. *Nat Rev Neurosci* 8:45–56.
- Bellocchio L, Lafenêtre P, Cannich A, Cota D, Puente N, Grandes P, Chaouloff F, Piazza PV, Marsicano G (2010) Bimodal control of stimulated food intake by the endocannabinoid system. *Nat Neurosci* 13:281–283.
- Belluscio L, Katz LC (2001) Symmetry, stereotypy, and topography of odorant representations in mouse olfactory bulbs. *J Neurosci* 21:2113–2122.
- Belluscio L, Koentges G, Axel R, Dulac C (1999) A map of pheromone receptor activation in the mammalian brain. *Cell* 97:209–220.
- Berkowitz BA, Roberts R, Goebel DJ, Luan H (2006) Noninvasive and simultaneous imaging of layer-specific retinal functional adaptation by manganese-enhanced MRI. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 47:2668–2674.
- Bermudez-Silva FJ, Viveros MP, McPartland JM, Rodriguez de Fonseca F (2010) The endocannabinoid system, eating behavior and energy homeostasis: the end or a new beginning? *Pharmacol Biochem Behav* 95:375–382.
- Berthoud H-R, Morrison C (2008) The Brain, Appetite, and Obesity. *Annu Rev Psychol* 59:55–92 Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.psych.59.103006.093551>.
- Berthoud HR, Neuhuber WL (2000) Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system. In: *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, pp 1–17.
- Beshel J, Kopell N, Kay LM (2007) Olfactory bulb gamma oscillations are enhanced with task demands. *J Neurosci* 27:8358–8365.
- Bewick GA, Gardiner J V, Dhillon WS, Kent AS, White NE, Webster Z, Gbatei MA, Bloom SR (2005) Post-embryonic ablation of AgRP neurons in mice leads to a lean, hypophagic phenotype. *FASEB J* 19:1680–1682.
- Blum ID, Patterson Z, Khazall R, Lamont EW, Sleeman MW, Horvath TL, Abizaid A (2009) Reduced anticipatory locomotor responses to scheduled meals in ghrelin receptor deficient mice. *Neuroscience* 164:351–359.
- Bock NA, Paiva FF, Silva AC (2008) Fractionated manganese-enhanced MRI. *NMR Biomed* 21:473–478.
- Boitard C, Cavaroc A, Sauviant J, Aubert A, Castanon N, Layé S, Ferreira G (2014) Impairment of hippocampal-dependent memory induced by juvenile high-fat diet intake is associated with enhanced hippocampal inflammation in rats. *Brain Behav Immun* 40:9–17 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24662056>.
- Boitard C, Etchamendy N, Sauviant J, Aubert A, Tronel S, Marighetto A, Layé S, Ferreira G (2012) Juvenile, but not adult exposure to high-fat diet impairs relational memory and hippocampal neurogenesis in mice. *Hippocampus* 22:2095–2100 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22593080>.
- Bozza T, McGann JP, Mombaerts P, Wachowiak M (2004) In vivo imaging of neuronal activity by targeted expression of a genetically encoded probe in the mouse. *Neuron* 42:9–21.

- Bressler SL (1984) Spatial organization of EEGs from olfactory bulb and cortex. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 57:270–276.
- Breton-Provencher V, Lemasson M, Peralta MR, Saghatelian A (2009) Interneurons produced in adulthood are required for the normal functioning of the olfactory bulb network and for the execution of selected olfactory behaviors. *J Neurosci* 29:15245–15257.
- Breunig E, Manzini I, Piscitelli F, Gutermann B, Marzo V Di, Schild D, Czesnik D (2010) The Endocannabinoid 2-Arachidonoyl-Glycerol Controls Odor Sensitivity in Larvae of *Xenopus laevis*. *Mol Physiol* 30:8965–8973.
- Brosch M, Budinger E, Scheich H (2002) Stimulus-related gamma oscillations in primate auditory cortex. *J Neurophysiol* 87:2715–2725.
- Brunjes PC (1994) Unilateral naris closure and olfactory system development. *Brain Res Rev* 19:146–160.
- Brunjes PC, Illig KR, Meyer EA (2005) A field guide to the anterior olfactory nucleus (cortex). *Brain Res Rev* 50:305–335.
- Buck L, Axel R (1991) A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* 65:175–187.
- Buonviso N, Amat C, Litaudon P (2006) Respiratory modulation of olfactory neurons in the rodent brain. *Chem Senses* 31:145–154.
- Buonviso N, Amat C, Litaudon P, Roux S, Royet J-P, Farget V, Sicard G (2003) Rhythm sequence through the olfactory bulb layers during the time window of a respiratory cycle. *Eur J Neurosci* 17:1811–1819.
- Burdakov D, Jensen LT, Alexopoulos H, Williams RH, Fearon IM, O’Kelly I, Gerasimenko O, Fugger L, Verkhratsky A (2006) Tandem-pore K⁺ channels mediate inhibition of orexin neurons by glucose. *Neuron* 50:711–722.
- Bushdid C, Magnasco MO, Vosshall LB, Keller a (2014) Humans can discriminate more than 1 trillion olfactory stimuli. *Science* 343:1370–1372 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24653035>.
- Buzsáki G, Anastassiou CA, Koch C (2012) The origin of extracellular fields and currents — EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nat Rev Neurosci* 13:407–420.
- Cabanac M, Duclaux R (1973) Olfactory-gustatory alliesthesia and food intake in humans. *J Physiol (Paris)* 66:113–135.
- Caillol M, Aïoun J, Baly C, Persuy M-A, Salesse R (2003) Localization of orexins and their receptors in the rat olfactory system: possible modulation of olfactory perception by a neuropeptide synthesized centrally or locally. *Brain Res* 960:48–61.
- Cardinal P, André C, Quarta C, Bellocchio L, Clark S, Elie M, Leste-Lasserre T, Maitre M, Gonzales D, Cannich A, Pagotto U, Marsicano G, Cota D (2014) CB1 cannabinoid receptor in SF1-expressing neurons of the ventromedial hypothalamus determines metabolic responses to diet and leptin. *Mol Metab* 3:705–716 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmet.2014.07.004>.
- Carey RM, Verhagen J V, Wesson DW, Pérez N, Wachowiak M (2009) Temporal Structure of Receptor Neuron Input to the Olfactory Bulb Imaged in Behaving Rats. *J Neurophysiol* 101:1073–1088.
- Cenier T, Amat C, Litaudon P, Garcia S, Lafaye de Micheaux P, Liqueur B, Roux S, Buonviso N (2008) Odor vapor pressure and quality modulate local field potential oscillatory patterns in the olfactory bulb of the anesthetized rat. *Eur J Neurosci* 27:1432–1440.
- Cenier T, David F, Litaudon P, Garcia S, Amat C, Buonviso N (2009) Respiration-gated formation of gamma and beta neural assemblies in the mammalian olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 29:921–930.
- Cersosimo MG, Koller WC (2006) The diagnosis of manganese-induced parkinsonism. *Neurotoxicology* 27:340–346.

- Chabaud P, Ravel N, Wilson DA, Mouly AM, Vigouroux M, Farget V, Gervais R (2000) Exposure to behaviourally relevant odour reveals differential characteristics in rat central olfactory pathways as studied through oscillatory activities. *Chem Senses* 25:561–573.
- Chapuis J, Garcia S, Messaoudi B, Thevenet M, Ferreira G, Gervais R, Ravel N (2009) The way an odor is experienced during aversive conditioning determines the extent of the network recruited during retrieval: a multisite electrophysiological study in rats. *J Neurosci* 29:10287–10298.
- Chapuis J, Messaoudi B, Ferreira G, Ravel N (2007) Importance of retronasal and orthonasal olfaction for odor aversion memory in rats. *Behav Neurosci* 121:1383–1392.
- Chapuis J, Wilson D a (2011) Bidirectional plasticity of cortical pattern recognition and behavioral sensory acuity. *Nat Neurosci* 15:155–161 Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nn.2966>.
- Chaudhury D, Escanilla O, Linster C (2009) Bulbar Acetylcholine Enhances Neural and Perceptual Odor Discrimination. *Drugs* 29:52–60.
- Chee MJS, Colmers WF (2008) Y eat? *Nutrition* 24:869–877.
- Chen HY, Trumbauer ME, Chen AS, Weingarth DT, Adams JR, Frazier EG, Shen Z, Marsh DJ, Feighner SD, Guan X-M, Ye Z, Nargund RP, Smith RG, Van Der Ploeg LHT, Howard AD, MacNeil DJ, Qian S (2004) Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by neuropeptide Y and agouti-related protein. *Endocrinology* 145:2607–2612.
- Chen WR, Shepherd GM (1997) Membrane and synaptic properties of mitral cells in slices of rat olfactory bulb. *Brain Res* 745:189–196.
- Chery R, Gurden H, Martin C (2014) Anesthetic regimes modulate the temporal dynamics of local field potential in the mouse olfactory bulb. *J Neurophysiol* 111:908–917 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24285865>.
- Chery R, L'Heureux B, Bendahmane M, Renaud R, Martin C, Pain F, Gurden H (2011) Imaging Odor-Evoked Activities in the Mouse Olfactory Bulb using Optical Reflectance and Autofluorescence Signals. *J Vis Exp*.
- Chess A, Simon I, Cedar H, Axel R (1994) Allelic inactivation regulates olfactory receptor gene expression. *Cell* 78:823–834 Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867494905622>.
- Chuang KH, Belluscio L, Koretsky AP (2010a) In vivo detection of individual glomeruli in the rodent olfactory bulb using manganese enhanced MRI. *Neuroimage* 49:1350–1356 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.09.060>.
- Chuang K-H, Belluscio L, Koretsky AP (2010b) In vivo detection of individual glomeruli in the rodent olfactory bulb using manganese enhanced MRI. *Neuroimage* 49:1350–1356.
- Chuang KH, Lee JH, Silva AC, Belluscio L, Koretsky AP (2009) Manganese enhanced MRI reveals functional circuitry in response to odorant stimuli. *Neuroimage* 44:363–372.
- Chung S, Parks GS, Lee C, Civelli O (2011) Recent updates on the melanin-concentrating hormone (MCH) and its receptor system: lessons from MCH1R antagonists. *J Mol Neurosci* 43:115–121.
- Clee SM, Attie AD (2007) The genetic landscape of type 2 diabetes in mice. *Endocr Rev* 28:48–83.
- Coleman DL (1978) Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetologia* 14:141–148.
- Colley B, Tucker K, Fadool DA (2004) Comparison of modulation of Kv1.3 channel by two receptor tyrosine kinases in olfactory bulb neurons of rodents. *Recept channels* 10:25–36.
- Collins S, Martin TL, Surwit RS, Robidoux J (2004) Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: Physiological and molecular characteristics. *Physiol Behav* 81:243–248.

- Courtio E, Amat C, Thévenet M, Messaoudi B, Garcia S, Buonviso N (2011) Reshaping of bulbar odor response by nasal flow rate in the Rat. *PLoS One* 6.
- Courtio E, Amat C, Thévenet M, Messaoudi B, Garcia S, Buonviso N (2011) Reshaping of bulbar odor response by nasal flow rate in the rat. *PLoS One* 6:e16445.
- Courtio E, Lefèvre L, Garcia S, Thévenet M, Messaoudi B, Buonviso N (2014) Sniff adjustment in an odor discrimination task in the rat: analytical or synthetic strategy? *Front Behav Neurosci* 8:145 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4017146&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Cowan CM, Roskams AJ (2002) Apoptosis in the mature and developing olfactory neuroepithelium. *Microsc Res Tech* 58:204–215 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12203699>.
- Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdán MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD, Low MJ (2001) Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 411:480–484.
- Crespo CS, Cachero AP, Jiménez LP, Barrios V, Ferreira EA (2014) Peptides and food intake. *Front Endocrinol (Lausanne)* 5.
- Cross DJ, Flexman J a, Anzai Y, Morrow TJ, Maravilla KR, Minoshima S (2006) In vivo imaging of functional disruption, recovery and alteration in rat olfactory circuitry after lesion. *Neuroimage* 32:1265–1272 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16859928>.
- Cross DJ, Flexman JA, Anzai Y, Maravilla KR, Minoshima S (2008) Age-related decrease in axonal transport measured by MR imaging in vivo. *Neuroimage* 39:915–926 Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S105381190700746X>.
- Cross DJ, Minoshima S, Anzai Y, Flexman J a., Keogh BP, Kim Y, Maravilla KR (2004) Statistical mapping of functional olfactory connections of the rat brain in vivo. *Neuroimage* 23:1326–1335.
- Csicsvari J, Jamieson B, Wise KD, Buzsáki G (2003) Mechanisms of gamma oscillations in the hippocampus of the behaving rat. *Neuron* 37:311–322.
- Curtis M a et al. (2007) Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension. *Science* 315:1243–1249.
- Czesnik D, Schild D, Kuduz J, Manzini I (2007) Cannabinoid action in the olfactory epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:2967–2972.
- Date Y, Ueta Y, Yamashita H, Yamaguchi H, Matsukura S, Kangawa K, Sakurai T, Yanagisawa M, Nakazato M (1999) Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:748–753.
- Davis H, Taylor AA, Norris C (1997) Preference for familiar humans by rats. *Psychon Bull Rev* 4:118–120.
- Davis JF, Choi DL, Benoit SC (2010) Insulin, leptin and reward. *Trends Endocrinol Metab* 21:68–74.
- De Jesús ML, Sallés J, Meana JJ, Callado LF (2006) Characterization of CB1 cannabinoid receptor immunoreactivity in postmortem human brain homogenates. *Neuroscience* 140:635–643.
- Deisig N, Giurfa M, Sandoz JC (2010) Antennal lobe processing increases separability of odor mixture representations in the honeybee. *J Neurophysiol* 103:2185–2194.
- Derby CD (2000) Learning from spiny lobsters about chemosensory coding of mixtures. *Physiol Behav* 69:203–209.
- DeSimone JA, Lyall V (2006) Taste receptors in the gastrointestinal tract III. Salty and sour taste: sensing of sodium and protons by the tongue. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 291:G1005–G1010.

- Desmaisons D, Vincent J, Lledo P (1999) Control of Action Potential Timing by Intrinsic Subthreshold Oscillations in Olfactory Bulb Output Neurons. *Solutions* 19:10727–10737.
- Di Marzo V (2009) The endocannabinoid system: its general strategy of action, tools for its pharmacological manipulation and potential therapeutic exploitation. *Pharmacol Res Off J Ital Pharmacol Soc* 60:77–84.
- Di Prisco G V, Freeman WJ (1985) Odor-related bulbar EEG spatial pattern analysis during appetitive conditioning in rabbits. *Behav Neurosci* 99:964–978.
- Dias BG, Ressler KJ (2014) Parental olfactory experience influences behavior and neural structure in subsequent generations. *Nat Neurosci* 17:89–96 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24292232>.
- Dielenberg R a., McGregor IS (2001) Defensive behavior in rats towards predatory odors: A review. *Neurosci Biobehav Rev* 25:597–609.
- Doyle KL, Karl T, Hort Y, Duffy L, Shine J, Herzog H (2008) Y1 receptors are critical for the proliferation of adult mouse precursor cells in the olfactory neuroepithelium. *J Neurochem* 105:641–652.
- Drews G, Krippeit-Drews P, Düfer M (2010) Electrophysiology of islet cells. *Adv Exp Med Biol* 654:115–163.
- Dubois A, Herard AS, Delatour B, Hantraye P, Bonvento G, Dhenain M, Delzescaux T (2010) Detection by voxel-wise statistical analysis of significant changes in regional cerebral glucose uptake in an APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroimage* 51:586–598 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20206704.
- Eeckman FH, Freeman WJ (1990) Correlations between unit firing and EEG in the rat olfactory system. *Brain Res* 528:238–244.
- Ellegood J, Babineau BA, Henkelman RM, Lerch JP, Crawley JN (2013) Neuroanatomical analysis of the BTBR mouse model of autism using magnetic resonance imaging and diffusion tensor imaging. *Neuroimage* 70:288–300 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23275046.
- Elmqvist JK, Bjørbaek C, Ahima RS, Flier JS, Saper CB (1998) Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J Comp Neurol* 395:535–547.
- Engel AK, Fries P (2010) Beta-band oscillations-signalling the status quo? *Curr Opin Neurobiol* 20:156–165.
- Eschenko O, Canals S, Simanova I, Beyerlein M, Murayama Y, Logothetis NK (2010a) Mapping of functional brain activity in freely behaving rats during voluntary running using manganese-enhanced MRI: Implication for longitudinal studies. *Neuroimage* 49:2544–2555 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.10.079>.
- Eschenko O, Canals S, Simanova I, Logothetis NK (2010b) Behavioral, electrophysiological and histopathological consequences of systemic manganese administration in MEMRI. *Magn Reson Imaging* 28:1165–1174 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mri.2009.12.022>.
- Esclassan F, Courtiol E, Thévenet M, Garcia S, Buonviso N, Litaudon P (2012) Faster, deeper, better: The impact of sniffing modulation on Bulbar olfactory processing. *PLoS One* 7.
- Fadool DA, Tucker K, Pedarzani P (2011) Mitral cells of the olfactory bulb perform metabolic sensing and are disrupted by obesity at the level of the Kv1.3 ion channel. *PLoS One* 6.
- Fadool DA, Tucker K, Phillips JJ, Simmen JA (2000) Brain insulin receptor causes activity-dependent current suppression in the olfactory bulb through multiple phosphorylation of Kv1.3. *J Neurophysiol* 83:2332–2348.
- Fan W, Ellacott KLJ, Halatchev IG, Takahashi K, Yu P, Cone RD (2004) Cholecystokinin-mediated suppression of feeding involves the brainstem melanocortin system. *Nat Neurosci* 7:335–336.
- Farbman AI (1994) The cellular basis of olfaction. *Endeavour* 18:2–8.

- Fehm HL, Kern W, Peters a. (2006) Chapter 7: The selfish brain: competition for energy resources. *Prog Brain Res* 153:129–140.
- Feinstein P, Mombaerts P (2004) A contextual model for axonal sorting into glomeruli in the mouse olfactory system. *Cell* 117:817–831.
- Firestein S (2001) How the olfactory system makes sense of scents. *Nature* 413:211–218.
- Fletcher ML, Masurkar A V, Xing J, Imamura F, Xiong W, Nagayama S, Mutoh H, Greer CA, Knopfel T, Chen WR (2009) Optical imaging of postsynaptic odor representation in the glomerular layer of the mouse olfactory bulb. *J Neurophysiol* 102:817–830.
- Flier JS (2004) Obesity Wars: Molecular Progress Confronts an Expanding Epidemic. *Cell* 116:337–350.
- Flohr ELR, Boesveldt S, Haehner A, Iannilli E, Sinding C, Hummel T (2015) Time-course of trigeminal versus olfactory stimulation: Evidence from chemosensory evoked potentials. *Int J Psychophysiol* 95:1–7 Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167876015000471>.
- Florant GL, Fenn AM, Healy JE, Wilkerson GK, Handa RJ (2010) To eat or not to eat: the effect of AICAR on food intake regulation in yellow-bellied marmots (*Marmota flaviventris*). *J Exp Biol* 213:2031–2037.
- Fontanini A, Bower JM (2005) Variable coupling between olfactory system activity and respiration in ketamine/xylazine anesthetized rats. *J Neurophysiol* 93:3573–3581.
- Foster MT, Song CK, Bartness TJ (2010) Hypothalamic paraventricular nucleus lesion involvement in the sympathetic control of lipid mobilization. *Obesity (Silver Spring)* 18:682–689.
- François A, Laziz I, Rimbaud S, Grebert D, Durieux D, Pajot-Augy E, Meunier N (2013) Early survival factor deprivation in the olfactory epithelium enhances activity-driven survival. *Front Cell Neurosci* 7:271 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3870945&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- FREEMAN WJ (1960) Correlation of electrical activity of prepyriform cortex and behavior in cat. *J Neurophysiol* 23:111–131.
- Freeman WJ, Schneider W (1982) Changes in spatial patterns of rabbit olfactory EEG with conditioning to odors. *Psychophysiology* 19:44–56.
- Fried HU, Fuss SH, Korsching SI (2002) Selective imaging of presynaptic activity in the mouse olfactory bulb shows concentration and structure dependence of odor responses in identified glomeruli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:3222–3227.
- Friedman JM (1998) Leptin, leptin receptors, and the control of body weight. *Nutr Rev* 56:s38–s46; discussion s54–s75.
- Friedman JM, Leibel RL, Siegel DS, Walsh J, Bahary N (1991) Molecular mapping of the mouse ob mutation. *Genomics* 11:1054–1062.
- Friedrich RW (2006) Mechanisms of odor discrimination: neurophysiological and behavioral approaches. *Trends Neurosci* 29:40–47.
- Frisch D (1967) Ultrastructure of mouse olfactory mucosa. *Am J Anat* 121:87–119 Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/aja.1001210107/abstract> <http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/aja.1001210107/asset/1001210107ftp.pdf?v=1&t=hdzzd8xb&s=70e3996369f3eaaf2e10e77173a5e7fdf6064873>.
- Friston KJ, Holmes AP, Poline JB, Grasby PJ, Williams SC, Frackowiak RS, Turner R (1995) Analysis of fMRI time-series revisited. *Neuroimage* 2:45–53.
- Friston KJ, Passingham RE, Nutt JG, Heather JD, Sawle G V, Frackowiak RS (1989) Localisation in PET images: direct fitting of the intercommissural (AC-PC) line. *J Cereb Blood Flow Metab* 9:690–695.

- Fuentes R a, Aguilar MI, Aylwin ML, Maldonado PE (2008) Neuronal activity of mitral-tufted cells in awake rats during passive and active odorant stimulation. *J Neurophysiol* 100:422–430.
- Furudono Y, Cruz G, Lowe G (2013) Glomerular input patterns in the mouse olfactory bulb evoked by retronasal odor stimuli. *BMC Neurosci* 14:45 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23565900>.
- Galef Jr BG, Wigmore SW (1983) Transfer of information concerning distant foods: A laboratory investigation of the “information-centre” hypothesis. *Anim Behav* 31:748–758 Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003347283802322> \n <http://ezproxy-prd.bodleian.ox.ac.uk:2054/science/article/pii/S0003347283802322> \n <http://ezproxy-prd.bodleian.ox.ac.uk:2054/science/article/pii/S0003347283802322/pdf?md5=67c3a7dab476215a58>.
- Gangadhar NM, Firestein SJ, Stockwell BR (2008) A novel role for jun N-terminal kinase signaling in olfactory sensory neuronal death. *Mol Cell Neurosci* 38:518–525 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2568995&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Garcia S, Fourcaud-Trocmé N (2009) OpenElectrophy: An Electrophysiological Data- and Analysis-Sharing Framework. *Front Neuroinform* 3:14.
- Gargiulo S, Greco A, Gramanzini M, Esposito S, Affuso A, Brunetti A, Vesce G, Ii F (2012) Mice anesthesia, analgesia, and care, Part I: anesthetic considerations in preclinical research. *ILAR J* 53:E55–E69 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23382271>.
- Garthwaite TL, Martinson DR, Tseng LF, Hagen TC, Menahan LA (1980) A longitudinal hormonal profile of the genetically obese mouse. *Endocrinology* 107:671–676.
- Garza JC, Guo M, Zhang W, Lu X-Y (2012) Leptin restores adult hippocampal neurogenesis in a chronic unpredictable stress model of depression and reverses glucocorticoid-induced inhibition of GSK-3 β / β -catenin signaling. *Mol Psychiatry* 17:790–808 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3368076&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Gautam SH, Verhagen J V. (2012) Retronasal Odor Representations in the Dorsal Olfactory Bulb of Rats. *J Neurosci* 32:7949–7959.
- George Paxinos KF (2012) Paxinos and Franklin’s the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. São Paulo, Acad Press:360 p. Available at: <https://www.elsevier.com/books/paxinos-and-franklins-the-mouse-brain-in-stereotaxic-coordinates/paxinos/978-0-12-391057-8>.
- Gerozissis K (2008) Brain insulin, energy and glucose homeostasis; genes, environment and metabolic pathologies. *Eur J Pharmacol* 585:38–49.
- Gervais R, Buonviso N, Martin C, Ravel N (2007) What do electrophysiological studies tell us about processing at the olfactory bulb level? *J Physiol Paris* 101:40–45.
- Getchell T V, Kwong K, Saunders CP, Stromberg AJ, Getchell ML (2006a) Leptin regulates olfactory-mediated behavior in ob/ob mice. *Physiol Behav* 87:848–856.
- Getchell T V., Kwong K, Saunders CP, Stromberg AJ, Getchell ML (2006b) Leptin regulates olfactory-mediated behavior in ob/ob mice. *Physiol Behav* 87:848–856.
- Gobbo OL, Petit F, Gurden H, Dhenain M (2012) In vivo detection of excitotoxicity by manganese- enhanced MRI: Comparison with physiological stimulation. *Magn Reson Med* 68:234–240.
- Gómez C, Briñón JG, Barbado M V, Weruaga E, Valero J, Alonso JR (2005) Heterogeneous targeting of centrifugal inputs to the glomerular layer of the main olfactory bulb. *J Chem Neuroanat* 29:238–254.
- González JA, Reimann F, Burdakov D (2009) Dissociation between sensing and metabolism of glucose in sugar sensing neurones. *J Physiol* 587:41–48.

- Good DJ (2005) Using obese mouse models in research: special considerations for IACUC members, animal care technicians, and researchers. *Lab Anim (NY)* 34:30–37.
- Gottfried J a (2010) Central mechanisms of odour object perception. *Nat Rev Neurosci* 11:628–641 Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrn2883> \npapers3://publication/doi/10.1038/nrn2883.
- Gourévitch B, Kay LM, Martin C (2010) Directional coupling from the olfactory bulb to the hippocampus during a go/no-go odor discrimination task. *J Neurophysiol* 103:2633–2641.
- Gray CM, Skinner JE (1988a) Centrifugal regulation of neuronal activity in the olfactory bulb of the waking rabbit as revealed by reversible cryogenic blockade. *Exp Brain Res* 69:378–386.
- Gray CM, Skinner JE (1988b) Centrifugal regulation of neuronal activity in the olfactory bulb of the waking rabbit as revealed by reversible cryogenic blockade. *Exp Brain Res* 69:378–386.
- Grinvald A, Lieke E, Frostig RD, Gilbert CD, Wiesel TN (1986) Functional architecture of cortex revealed by optical imaging of intrinsic signals. *Nature* 324:361–364.
- Grosmaître X, Santarelli LC, Tan J, Luo M, Ma M (2007) Dual functions of mammalian olfactory sensory neurons as odor detectors and mechanical sensors. *Nat Neurosci* 10:348–354.
- Grossman KJ, Mallik AK, Ross J, Kay LM, Issa NP (2008) Glomerular activation patterns and the perception of odor mixtures. *Eur J Neurosci* 27:2676–2685.
- Grünecker B, Kaltwasser SF, Zappe AC, Bedenk BT, Bicker Y, Spormaker VI, Wotjak CT, Czisch M (2013) Regional specificity of manganese accumulation and clearance in the mouse brain: Implications for manganese-enhanced MRI. *NMR Biomed* 26:542–556.
- Gurden H, Uchida N, Mainen ZF (2006) Sensory-evoked intrinsic optical signals in the olfactory bulb are coupled to glutamate release and uptake. *Neuron* 52:335–345.
- Gutiérrez-Mecinas M, Crespo C, Blasco-Ibáñez JM, Gracia-Llanes FJ, Marqués-Marí AI, Martínez-Guijarro FJ (2005) Characterization of somatostatin- and cholecystokinin-immunoreactive periglomerular cells in the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol* 489:467–479.
- Gutzwiller J-P, Degen L, Matzinger D, Prestin S, Beglinger C (2004) Interaction between GLP-1 and CCK-33 in inhibiting food intake and appetite in men.
- Haberly LB (2001) Parallel-distributed processing in olfactory cortex: new insights from morphological and physiological analysis of neuronal circuitry. *Chem Senses* 26:551–576.
- Hagiwara A, Pal SK, Sato TF, Wienisch M, Murthy VN (2012) Optophysiological analysis of associational circuits in the olfactory cortex. *Front Neural Circuits* 6:18 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22529781>.
- Hallschmid M, Benedict C, Born J, Fehm H-L, Kern W (2004) Manipulating central nervous mechanisms of food intake and body weight regulation by intranasal administration of neuropeptides in man. *Physiol Behav* 83:55–64.
- Hammen GF, Turaga D, Holy TE, Meeks JP (2014) Functional organization of glomerular maps in the mouse accessory olfactory bulb. *Nat Neurosci* 17:953–961 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24880215>.
- Hanson LR, Frey WH (2007) Strategies for intranasal delivery of therapeutics for the prevention and treatment of neuroAIDS. *J neuroimmune Pharmacol Off J Soc NeuroImmune Pharmacol* 2:81–86.
- Hanson LR, Frey WH (2008) Intranasal delivery bypasses the blood-brain barrier to target therapeutic agents to the central nervous system and treat neurodegenerative disease. *BMC Neurosci* 9 Suppl 3:S5.
- Hardy AB, Aïoun J, Baly C, Julliard K a, Caillol M, Salesse R, Duchamp-Viret P (2005) Orexin A modulates mitral cell activity in the rat olfactory bulb: patch-clamp study on slices and immunocytochemical localization of orexin receptors. *Endocrinology* 146:4042–4053.

- Harrold JA (2004) Leptin leads hypothalamic feeding circuits in a new direction. *BioEssays* 26:1043–1045.
- Harvey J, Hardy SC, Irving a J, Ashford ML (2000) Leptin activation of ATP-sensitive K⁺ (KATP) channels in rat CRI-G1 insulinoma cells involves disruption of the actin cytoskeleton. *J Physiol* 527 Pt 1:95–107.
- Harvey J, McKenna F, Herson PS, Spanswick D, Ashford ML (1997) Leptin activates ATP-sensitive potassium channels in the rat insulin-secreting cell line, CRI-G1. *J Physiol* 504 (Pt 3:527–535.
- Hayar A, Karnup S, Shipley MT, Ennis M (2004) Olfactory bulb glomeruli: external tufted cells intrinsically burst at theta frequency and are entrained by patterned olfactory input. *J Neurosci* 24:1190–1199.
- Hayden S, Bekaert M, Crider TA, Mariani S, Murphy WJ, Teeling EC (2010) Ecological adaptation determines functional mammalian olfactory subgenomes. *Genome Res* 20:1–9.
- Heale VR, Vanderwolf CH, Kavaliers M (1994) Components of weasel and fox odors elicit fast wave bursts in the dentate gyrus of rats. *Behav Brain Res* 63:159–165.
- Heeger DJ, Ress D (2002) What does fMRI tell us about neuronal activity? *Nat Rev Neurosci* 3:142–151.
- Hermann H, Lutz B (2005) Coexpression of the cannabinoid receptor type 1 with the corticotropin-releasing hormone receptor type 1 in distinct regions of the adult mouse forebrain. *Neurosci Lett* 375:13–18.
- HETHERINGTON AW, RANSON SW (1942) EFFECT OF EARLY HYPOPHYSECTOMY ON HYPOTHALAMIC OBESITY. *Endocrinology* 31:30–34.
- Honda T, Wada E, Battey JF, Wank SA (1993) Differential Gene Expression of CCK(A) and CCK(B) Receptors in the Rat Brain. *Mol Cell Neurosci* 4:143–154.
- Hsia AY et al. (1999) Dopamine Depresses Synaptic Inputs Into the Olfactory Bulb Dopamine Depresses Synaptic Inputs Into the Olfactory Bulb. *J Neurophysiol*:1082–1085.
- Huang XF, Lin S, Zhang R (1997) Upregulation of leptin receptor mRNA expression in obese mouse brain. *Neuroreport* 8:1035–1038 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9141087>.
- Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, Gu W, Kesterson RA, Boston BA, Cone RD, Smith FJ, Campfield LA, Burn P, Lee F (1997) Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 88:131–141.
- Igarashi KM, Ieki N, An M, Yamaguchi Y, Nagayama S, Kobayakawa K, Kobayakawa R, Tanifuji M, Sakano H, Chen WR, Mori K (2012) Parallel Mitral and Tufted Cell Pathways Route Distinct Odor Information to Different Targets in the Olfactory Cortex. *J Neurosci* 32:7970–7985.
- Imai T (2014a) Construction of functional neuronal circuitry in the olfactory bulb. *Semin Cell Dev Biol* 35:180–188 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.07.012>.
- Imai T (2014b) Construction of functional neuronal circuitry in the olfactory bulb. *Semin Cell Dev Biol* 35:180–188.
- Imayoshi I, Sakamoto M, Ohtsuka T, Takao K, Miyakawa T, Yamaguchi M, Mori K, Ikeda T, Itohara S, Kageyama R (2008) Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nat Neurosci* 11:1153–1161.
- Ingalls AM, Dickie MM, Snell GD (1996) Obese, a new mutation in the house mouse. *Obes Res* 4:101.
- Inoue T, Majid T, Pautler RG (2011) Manganese enhanced MRI (MEMRI): Neurophysiological applications. *Rev Neurosci* 22:675–694.
- Irving AJ, Harvey J (2014) Leptin regulation of hippocampal synaptic function in health and disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 369:20130155 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24298156>.

- Isaacson JS (2010) Odor representations in mammalian cortical circuits. *Curr Opin Neurobiol* 20:328–331.
- Jia C, Hegg CC (2010) NPY mediates ATP-induced neuroproliferation in adult mouse olfactory epithelium. *Neurobiol Dis* 38:405–413.
- Jiang T, Soussignan R, Rigaud D, Martin S, Royet J, Brondel L, Schaal B (2008) Physiology & Behavior Alliesthesia to food cues : Heterogeneity across stimuli and sensory modalities. *Physiol Behav* 95:464–470.
- Johnson BA, Ho SL, Xu Z, Yihan JS, Yip S, Hingco EE, Leon M (2002) Functional mapping of the rat olfactory bulb using diverse odorants reveals modular responses to functional groups and hydrocarbon structural features. *J Comp Neurol* 449:180–194.
- Johnson BA, Leon M (2007) Chemotopic odorant coding in a mammalian olfactory system. *J Comp Neurol* 503:1–34.
- Jones S V, Choi DC, Davis M, Ressler KJ (2008) Learning-dependent structural plasticity in the adult olfactory pathway. *J Neurosci* 28:13106–13111.
- Julliard a K, Chaput M a, Apfelbaum a, Aimé P, Mahfouz M, Duchamp-Viret P (2007) Changes in rat olfactory detection performance induced by orexin and leptin mimicking fasting and satiation. *Behav Brain Res* 183:123–129.
- Kanasaki K, Koya D (2011) Biology of obesity: lessons from animal models of obesity. *J Biomed Biotechnol* 2011:197636.
- Karlsson AC, Lindroos AK, Lissner L, Torgerson JS, Carlsson B, Carlsson LMS, Sjöström L (2002) Evidence for gender-specific associations between leptin and olfaction. *J genderspecific Med JGSM Off J Partnersh Womens Heal Columbia* 5:25–32.
- Kass MD, Rosenthal MC, Pottackal J, McGann JP (2013) Fear learning enhances neural responses to threat-predictive sensory stimuli. *Science* 342:1389–1392 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24337299>.
- Kauer JS (2002) On the scents of smell in the salamander. *Nature* 417:336–342.
- Kawai F (1999) Simulation analysis of effects of adrenaline on spike generation in olfactory receptor cells. *Chem Senses* 24:701–704.
- Kay LM (2003) Two species of gamma oscillations in the olfactory bulb: dependence on behavioral state and synaptic interactions. *J Integr Neurosci* 2:31–44.
- Kay LM (2005) Theta oscillations and sensorimotor performance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:3863–3868.
- Kay LM, Beshel J, Brea J, Martin C, Rojas-Líbano D, Kopell N (2009) Olfactory oscillations: the what, how and what for. *Trends Neurosci* 32:207–214.
- Kay LM, Stopfer M (2006) Information processing in the olfactory systems of insects and vertebrates. *Semin Cell Dev Biol* 17:433–442.
- Kettner NM, Mayo SA, Hua J, Lee C, Moore DD, Fu L (2015) Circadian Dysfunction Induces Leptin Resistance in Mice. *Cell Metab*:1–12 Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413115002727>.
- Kida I, Xu F, Shulman RG, Hyder F (2002) Mapping at glomerular resolution: fMRI of rat olfactory bulb. *Magn Reson Med* 48:570–576.
- Kikuta S, Sakamoto T, Nagayama S, Kanaya K, Kinoshita X, Kondo K, Tsunoda K, Mori K, Yamasoba T (2015) Sensory Deprivation Disrupts Homeostatic Regeneration of Newly Generated Olfactory Sensory Neurons after Injury in Adult Mice. *35:2657–2673*.
- Kishi T, Elmquist JK (2005) Body weight is regulated by the brain: a link between feeding and emotion. *Mol Psychiatry* 10:132–146.

- Kiyokage E, Pan Y-Z, Shao Z, Kobayashi K, Szabo G, Yanagawa Y, Obata K, Okano H, Toida K, Puche AC, Shipley MT (2010) Molecular identity of periglomerular and short axon cells. *J Neurosci* 30:1185–1196.
- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K (1999) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402:656–660.
- Kola B, Farkas I, Christ-Crain M, Wittmann G, Lolli F, Amin F, Harvey-White J, Liposits Z, Kunos G, Grossman AB, Fekete C, Korbónits M (2008) The orexigenic effect of ghrelin is mediated through central activation of the endogenous cannabinoid system. *PLoS One* 3:e1797 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2258435&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Komano-Inoue S, Manabe H, Ota M, Kusumoto-Yoshida I, Yokoyama TK, Mori K, Yamaguchi M (2014) Top-down inputs from the olfactory cortex in the postprandial period promote elimination of granule cells in the olfactory bulb. *Eur J Neurosci*.
- Kopell N, Ermentrout GB, Whittington MA, Traub RD (2000) Gamma rhythms and beta rhythms have different synchronization properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1867–1872.
- Koretsky AP (2012) Is there a path beyond BOLD? Molecular imaging of brain function. *Neuroimage* 62:1208–1215.
- Kuczewski N, Fourcaud-Trocmé N, Savigner A, Thevenet M, Aimé P, Garcia S, Duchamp-Viret P, Palouzier-Paulignan B (2014a) Insulin modulates network activity in olfactory bulb slices: impact on odour processing. *J Physiol* 592:2751–2769 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24710056>.
- Kuczewski N, Fourcaud-Trocmé N, Savigner A, Thevenet M, Aimé P, Garcia S, Duchamp-Viret P, Palouzier-Paulignan B (2014b) Insulin modulates network activity in olfactory bulb slices: impact on odour processing. *J Physiol* 592:2751–2769.
- Kuliczowska-Plaksej J, Milewicz A, Jakubowska J (2012) Neuroendocrine control of metabolism. *Gynecol Endocrinol* 28:27–32.
- Kyrou I, Chrousos GP, Tsigos C (2006) Stress, visceral obesity, and metabolic complications. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*, pp 77–110.
- Lacroix M-C, Badonnel K, Meunier N, Tan F, Schlegel-Le Poupon C, Durieux D, Monnerie R, Baly C, Congar P, Salesse R, Caillol M (2008) Expression of insulin system in the olfactory epithelium: first approaches to its role and regulation. *J Neuroendocrinol* 20:1176–1190.
- Lagier S, Carleton A, Lledo P-M (2004) Interplay between local GABAergic interneurons and relay neurons generates gamma oscillations in the rat olfactory bulb. *J Neurosci* 24:4382–4392.
- Lau JC, Lerch JP, Sled JG, Henkelman RM, Evans AC, Bedell BJ (2008) Longitudinal neuroanatomical changes determined by deformation-based morphometry in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroimage* 42:19–27 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18547819.
- Laugerette F, Passilly-Degrace P, Patris B, Niot I, Febbraio M, Montmayeur J-P, Besnard P (2005) CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions. *J Clin Invest* 115:3177–3184.
- Laurent G (1997) Olfactory processing: Maps, time and codes. *Curr Opin Neurobiol* 7:547–553.
- Lauterbur PC, Dias MHM, Rudin AM (1978) Augmentation of tissue water proton spin-lattice relaxation rates by in vivo addition of paramagnetic ions. *Front Biol Energ, [Pap Int Symp]* 1:752–759.
- Laziz I, Larbi a, Grebert D, Sautel M, Congar P, Lacroix MC, Salesse R, Meunier N (2011) Endothelin as a neuroprotective factor in the olfactory epithelium. *Neuroscience* 172:20–29.
- LE MAGNEN J (1956) Role of olfacto-gustatory stimulations in the mechanism of regulation of alimentary intake. *Ann la Nutr l'alimentation* 10:153–188.

- Le Magnen J (1999a) Increased food intake induced in rats by changes in the satiating sensory input from food (first published in French in 1956). *Appetite* 33:33–35.
- Le Magnen J (1999b) A role for caloric density of the diet in the mechanism of acquisition of appetites (first published in French in 1957). *Appetite* 33:17–20.
- Le Magnen J (1999c) Influence of hunger on the expression of discriminative appetite by the rat (first published in French in 1960). *Appetite* 33:52–54.
- Le Magnen J (2001) My scientific life: 40 years at the College de France. *Neurosci Biobehav Rev* 25:375–394.
- Le Magnen J, Julien N (1999a) Effects of postprandial administration of insulin on food intake by the white rat and the mechanism of appetite for energy (first published in French in 1956). *Appetite* 33:8–13.
- Le Magnen J, Julien N (1999b) Efficacy of olfactory, tactile and other food stimuli in the acquisition and manifestation of appetite in rats (first published in French in 1959). *Appetite* 33:43–51.
- Lecoq J, Tiret P, Najac M, Shepherd GM, Greer C a, Charpak S (2009) Odor-evoked oxygen consumption by action potential and synaptic transmission in the olfactory bulb. *J Neurosci* 29:1424–1433.
- Lee JH, Durand R, Gradinaru V, Zhang F, Goshen I, Kim D-S, Fenno LE, Ramakrishnan C, Deisseroth K (2010) Global and local fMRI signals driven by neurons defined optogenetically by type and wiring. *Nature* 465:788–792.
- Lee YS et al. (2006) A POMC variant implicates β -melanocyte-stimulating hormone in the control of human energy balance. *Cell Metab* 3:135–140.
- Leergaard TB, Bjaalie JG, Devor A, Wald LL, Dale AM (2003) In vivo tracing of major rat brain pathways using manganese-enhanced magnetic resonance imaging and three-dimensional digital atlasing. *Neuroimage* 20:1591–1600.
- Lehallier B, Andrey P, Maurin Y, Bonny JM (2011) Iterative algorithm for spatial and intensity normalization of MEMRI images. Application to tract-tracing of rat olfactory pathways. *Magn Reson Imaging* 29:1304–1316 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mri.2011.07.014>.
- Lehallier B, Rampin O, Saint-Albin A, Jérôme N, Ouali C, Maurin Y, Bonny JM (2012) Brain Processing of Biologically Relevant Odors in the Awake Rat, as Revealed by Manganese-Enhanced MRI. *PLoS One* 7:1–10.
- Lepousez G, Lledo PM (2013) Odor Discrimination Requires Proper Olfactory Fast Oscillations in Awake Mice. *Neuron* 80:1010–1024.
- Levasseur G, Baly C, Grébert D, Durieux D, Salesse R, Caillol M (2004) Anatomical and functional evidence for a role of arginine-vasopressin (AVP) in rat olfactory epithelium cells. *Eur J Neurosci* 20:658–670.
- Levin BE (2001) Glucosensing neurons do more than just sense glucose. *Int J Obes Relat Metab Disord J Int Assoc Study Obes* 25 Suppl 5:S68–S72.
- Li C, Jones PM, Persaud SJ (2011) Role of the endocannabinoid system in food intake, energy homeostasis and regulation of the endocrine pancreas. *Pharmacol Ther* 129:307–320.
- Lin DY, Shea SD, Katz LC (2006) Representation of natural stimuli in the rodent main olfactory bulb. *Neuron* 50:937–949.
- Lin HC, Chey WY (2003) Cholecystokinin and peptide YY are released by fat in either proximal or distal small intestine in dogs. *Regul Pept* 114:131–135.
- Lin YJ, Koretsky AP (1997) Manganese ion enhances T1-weighted MRI during brain activation: an approach to direct imaging of brain function. *Magn Reson Med* 38:378–388.
- Lindström P (2007) The physiology of obese-hyperglycemic mice [ob/ob mice]. *ScientificWorldJournal* 7:666–685.

- Linster C, Johnson BA, Morse A, Yue E, Leon M (2002) Spontaneous versus Reinforced Olfactory Discriminations. *Anim Cogn* 22:6842–6845.
- Linster C, Johnson BA, Yue E, Morse A, Xu Z, Hingco EE, Choi Y, Choi M, Messiha A, Leon M (2001) Perceptual correlates of neural representations evoked by odorant enantiomers. *J Neurosci* 21:9837.
- Liu H, Kishi T, Roseberry AG, Cai X, Lee CE, Montez JM, Friedman JM, Elmquist JK (2003) Transgenic mice expressing green fluorescent protein under the control of the melanocortin-4 receptor promoter. *J Neurosci* 23:7143–7154 ST – Transgenic mice expressing green flu Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12904474.
- Logothetis NK (2002) The neural basis of the blood-oxygen-level-dependent functional magnetic resonance imaging signal. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 357:1003–1037.
- Logothetis NK (2003) The underpinnings of the BOLD functional magnetic resonance imaging signal. *J Neurosci* 23:3963–3971.
- Logothetis NK, Pauls J, Augath M, Trinath T, Oeltermann A (2001) Neurophysiological investigation of the basis of the fMRI signal. *Nature* 412:150–157.
- Lohr C, Thyssen A, Hirnet D (2011) Extrasynaptic neuron-glia communication: The how and why. *Commun Integr Biol* 4:109–111.
- Lowry CA, Kay LM (2007) Chemical factors determine olfactory system beta oscillations in waking rats. *J Neurophysiol* 98:394–404.
- Luquet S, Magnan C (2009) The central nervous system at the core of the regulation of energy homeostasis. *Front Biosci (Schol Ed)* 1:448–465.
- Luskin MB (1993) Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* 11:173–189.
- Lutz TA, Woods SC (2012) Overview of animal models of obesity. *Curr Protoc Pharmacol*.
- Ma J, Dankulich-Nagrudny L, Lowe G (2013) Cholecystokinin: An Excitatory Modulator of Mitral/Tufted Cells in the Mouse Olfactory Bulb. *PLoS One* 8.
- Macht M (1999) Characteristics of Eating in Anger , Fear , Sadness and Joy Institute for Psychology (I), University of Wu. *Psychology*:129–139.
- Macrides F, Eichenbaum HB, Forbes WB (1982) Temporal relationship between sniffing and the limbic theta rhythm during odor discrimination reversal learning. *J Neurosci* 2:1705–1717.
- Maes F, Collignon A, Vandermeulen D, Marchal G, Suetens P (1997) Multimodality image registration by maximization of mutual information. *IEEE Trans Med Imaging* 16:187–198.
- Maher BJ, Westbrook GL, Benarroch EE (2011) Co-Transmission of Dopamine and GABA in Periglomerular Cells Co-Transmission of Dopamine and GABA in Periglomerular Cells. *J Neurophysiol*:1559–1564.
- Mainland JD, Lundström JN, Reisert J, Lowe G (2014) From molecule to mind: An integrative perspective on odor intensity. *Trends Neurosci* 37:443–454.
- Majdič G (2009) Integrative role of brain and hypothalamus in the control of energy balance. *Acta Chim Slov* 56:289–296.
- Majid T, Ali YO, Venkitaramani D V., Jang M-K, Lu H-C, Pautler RG (2014) In vivo axonal transport deficits in a mouse model of fronto-temporal dementia. *NeuroImage Clin* 4:711–717 Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213158214000230> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4053640&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Mak GK, Weiss S (2010) Paternal recognition of adult offspring mediated by newly generated CNS neurons. *Nat Neurosci* 13:753–758.
- Malnic B, Godfrey PA, Buck LB (2004) The human olfactory receptor gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:2584–2589.
- Malnic B, Hirono J, Sato T, Buck LB (1999) Combinatorial receptor codes for odors. *Cell* 96:713–723.
- Manabe H, Mori K (2013) Sniff rhythm-paced fast and slow gamma-oscillations in the olfactory bulb: relation to tufted and mitral cells and behavioral states. *J Neurophysiol* 110:1593–1599 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23864376>.
- Mariano ED (2015) Adult stem cells in neural repair: Current options, limitations and perspectives. *World J Stem Cells* 7:477 Available at: <http://www.wjgnet.com/1948-0210/full/v7/i2/477.htm>.
- Marks DR, Tucker K, Cavallin MA, Mast TG, Fadool DA (2009) Awake intranasal insulin delivery modifies protein complexes and alters memory, anxiety, and olfactory behaviors. *J Neurosci* 29:6734–6751.
- Martin B, Maudsley S, White CM, Egan JM (2009) Hormones in the naso-oropharynx: endocrine modulation of taste and smell. *Trends Endocrinol Metab* 20:163–170.
- Martin C, Beshel J, Kay LM (2007) An olfacto-hippocampal network is dynamically involved in odor-discrimination learning. *J Neurophysiol* 98:2196–2205.
- Martin C, Gervais R, Hugues E, Messaoudi B, Ravel N (2004a) Learning modulation of odor-induced oscillatory responses in the rat olfactory bulb: A correlate of odor recognition? *J Neurosci* 24:389.
- Martin C, Gervais R, Hugues E, Messaoudi B, Ravel N (2004b) Learning modulation of odor-induced oscillatory responses in the rat olfactory bulb: a correlate of odor recognition? *J Neurosci* 24:389–397.
- Martin C, Gervais R, Messaoudi B, Ravel N (2006) Learning-induced oscillatory activities correlated to odour recognition: a network activity. *Eur J Neurosci* 23:1801–1810.
- Martin C, Houitte D, Guillermier M, Petit F, Bonvento G, Gurden H (2012) Alteration of sensory-evoked metabolic and oscillatory activities in the olfactory bulb of GLAST-deficient mice. *Front Neural Circuits* 6.
- Martin C, Ravel N (2014) Beta and gamma oscillatory activities associated with olfactory memory tasks: different rhythms for different functional networks? *Front Behav Neurosci* 8:218 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4066841&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Masamoto K, Kim T, Fukuda M, Wang P, Kim SG (2007) Relationship between neural, vascular, and BOLD signals in isoflurane-anesthetized rat somatosensory cortex. *Cereb Cortex* 17:942–950.
- Masse NY, Turner GC, Jefferis GSXE (2009) Olfactory information processing in *Drosophila*. *Curr Biol* 19:R700–R713.
- Matheny M, Zhang Y, Shapiro A, Tümer N, Scarpance PJ (2009) Central overexpression of leptin antagonist reduces wheel running and underscores importance of endogenous leptin receptor activity in energy homeostasis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297:R1254–R1261.
- Matsui A, Go Y, Niimura Y (2010) Degeneration of olfactory receptor gene repertoires in primates: No direct link to full trichromatic vision. *Mol Biol Evol* 27:1192–1200.
- Matsumura S, Eguchi A, Mizushige T, Kitabayashi N, Tsuzuki S, Inoue K, Fushiki T (2009) Colocalization of GPR120 with phospholipase-Cbeta2 and alpha-gustducin in the taste bud cells in mice. *Neurosci Lett* 450:186–190.
- Mattes RD (1997) Physiologic responses to sensory stimulation by food: nutritional implications. *J Am Diet Assoc* 97:406–413.
- Mayer J (1996) Glucostatic mechanism of regulation of food intake. 1953. *Obes Res* 4:493–496.

- Mayorov A V, Amara N, Chang JY, Moss JA, Hixon MS, Ruiz DI, Meijler MM, Zorrilla EP, Janda KD (2008) Catalytic antibody degradation of ghrelin increases whole-body metabolic rate and reduces refeeding in fasting mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:17487–17492.
- McAllister EJ et al. (2009) Ten putative contributors to the obesity epidemic. *Crit Rev Food Sci Nutr* 49:868–913.
- McLean JH, Shipley MT, Nickell WT, Aston-Jones G, Reyher CK (1989) Chemoanatomical organization of the noradrenergic input from locus coeruleus to the olfactory bulb of the adult rat. *J Comp Neurol* 285:339–349.
- McLean JH, Shipley T (1987) Serotonergic Afferents to the Rat Olfactory Bulb : I . Origins and Laminar Specificity of Serotonergic Inputs in the Adult Rat. October 7.
- Meister M, Bonhoeffer T (2001) Tuning and topography in an odor map on the rat olfactory bulb. *J Neurosci* 21:1351–1360.
- Mercer LD, Beart PM (2004) Immunolocalization of CCK1R in rat brain using a new anti-peptide antibody. *Neurosci Lett* 359:109–113.
- Migrenne S, Magnan C, Cruciani-Guglielmacci C (2007) Fatty acid sensing and nervous control of energy homeostasis. *Diabetes Metab* 33:177–182.
- Minoshima S, Koeppe RA, Kuhl DE, Arimizu N (1994) Integrated and automated data analysis for neuronal activation studies using positron emission tomography: methodology and applications.
- Miro JL, Canguilhem B, Schmitt P, Koch A (1982) Hyperphagia and obesity after olfactory bulbectomy performed at different times of the year in the European hamster. *Physiol Behav* 29:681–685.
- Mombaerts P (1999) Seven-Transmembrane Proteins as Odorant and Chemosensory Receptors. *Science* (80-) 286:707–711.
- Mombaerts P (2004) Genes and ligands for odorant, vomeronasal and taste receptors. *Nat Rev Neurosci* 5:263–278.
- Morash B, Li A, Murphy PR, Wilkinson M, Ur E (1999) Leptin gene expression in the brain and pituitary gland. *Endocrinology* 140:5995–5998.
- Moreno MM, Linster C, Escanilla O, Sacquet J, Didier A, Mandairon N (2009) Olfactory perceptual learning requires adult neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:17980–17985.
- Mori K, Manabe H, Narikiyo K, Onisawa N (2013) Olfactory consciousness and gamma oscillation couplings across the olfactory bulb, olfactory cortex, and orbitofrontal cortex. *Front Psychol* 4:743 Available at: <http://www.frontiersin.org/Journal/10.3389/fpsyg.2013.00743/abstract>.
- Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW (2006) Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 443:289–295.
- Morton GJ, Meek TH, Schwartz MW (2014) Neurobiology of food intake in health and disease. *Nat Rev Neurosci* 15:367–378 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24840801>.
- Mouret A, Gheusi G, Gabellec M-M, de Chaumont F, Olivo-Marin J-C, Lledo P-M (2008) Learning and survival of newly generated neurons: when time matters. *J Neurosci* 28:11511–11516.
- Mul JD, van Boxtel R, Bergen DJM, Brans MAD, Brakkee JH, Toonen PW, Garner KM, Adan RAH, Cuppen E (2012) Melanocortin Receptor 4 Deficiency Affects Body Weight Regulation, Grooming Behavior, and Substrate Preference in the Rat. *Obesity* 20:612–621.
- Müller TD et al. (2015) Ghrelin. *Mol Metab* 4:437–460.
- Mulligan C, Moreau K, Brandolini M, Livingstone B, Beaufrère B, Boirie Y (2002) Alterations of sensory perceptions in healthy elderly subjects during fasting and refeeding. *Gerontology* 48:39–43.

- Munakata M, Kobayashi K, Niisato-Nezu J, Tanaka S, Kakisaka Y, Ebihara T, Ebihara S, Haginoya K, Tsuchiya S, Onuma A (2008) Olfactory stimulation using black pepper oil facilitates oral feeding in pediatric patients receiving long-term enteral nutrition. *Tohoku J Exp Med* 214:327–332.
- Murdoch B, Roskams a. J (2007) Olfactory epithelium progenitors: Insights from transgenic mice and in vitro biology. *J Mol Histol* 38:581–599.
- Nagayama S, Enerva A, Fletcher ML, Masurkar A V, Igarashi KM, Mori K, Chen WR (2010) Differential axonal projection of mitral and tufted cells in the mouse main olfactory system. *Front Neural Circuits* 4.
- Nagayama S, Homma R, Imamura F (2014) Neuronal organization of olfactory bulb circuits. *Front Neural Circuits* 8:1–19 Available at: <http://journal.frontiersin.org/journal/10.3389/fncir.2014.00098/full>.
- Negoias S, Visschers R, Boelrijk A, Hummel T (2008) New ways to understand aroma perception. *Food Chem* 108:1247–1254.
- Negróni J, Meunier N, Monnerie R, Salesse R, Baly C, Caillol M, Congar P (2012) Neuropeptide Y enhances olfactory mucosa responses to odorant in hungry rats. *PLoS One* 7:e45266 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3443224&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Neville KR, Haberly LB (2003) Beta and gamma oscillations in the olfactory system of the urethane-anesthetized rat. *J Neurophysiol* 90:3921–3930.
- Ng KL, Li J-D, Cheng MY, Leslie FM, Lee AG, Zhou Q-Y (2005) Dependence of olfactory bulb neurogenesis on prokineticin 2 signaling. *Science* 308:1923–1927.
- Niimura Y (2012) Olfactory Receptor Multigene Family in Vertebrates: From the Viewpoint of Evolutionary Genomics. *Curr Genomics* 13:103–114.
- Niimura Y, Matsui a., Touhara K (2014) Extreme expansion of the olfactory receptor gene repertoire in African elephants and evolutionary dynamics of orthologous gene groups in 13 placental mammals. *Genome Res*:1485–1496 Available at: <http://genome.cshlp.org/cgi/doi/10.1101/gr.169532.113>.
- Niimura Y, Nei M (2003) Evolution of olfactory receptor genes in the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:12235–12240 Available at: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/efetch.fcgi?dbfrom=pubmed&id=14507991&retmode=ref&cmd=prlinks&npapers3://publication/doi/10.1073/pnas.1635157100>.
- Nilsson C, Raun K, Yan F, Larsen MO, Tang-Christensen M (2012) Laboratory animals as surrogate models of human obesity. *Acta Pharmacol Sin* 33:173–181.
- Nishizumi H, Sakano H (2015) Developmental regulation of neural map formation in the mouse olfactory system. *Dev Neurobiol*:n/a – n/a Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/dneu.22268>.
- Nissant A, Bardy C, Katagiri H, Murray K, Lledo P-M (2009) Adult neurogenesis promotes synaptic plasticity in the olfactory bulb. *Nat Neurosci* 12:728–730.
- Nomura T, Takahashi S, Ushiki T (2004) Cytoarchitecture of the normal rat olfactory epithelium: light and scanning electron microscopic studies. *Arch Histol Cytol* 67:159–170.
- Nusser Z, Kay LM, Laurent G, Homanics GE, Mody I (2001) Disruption of GABA(A) receptors on GABAergic interneurons leads to increased oscillatory power in the olfactory bulb network. *J Neurophysiol* 86:2823–2833.
- O'Doherty J, Rolls ET, Francis S, Bowtell R, McGlone F, Kobal G, Renner B, Ahne G (2000) Sensory-specific satiety-related olfactory activation of the human orbitofrontal cortex. *Neuroreport* 11:893–897.
- O'Rahilly S (2009) Human genetics illuminates the paths to metabolic disease. *Nature* 462:307–314.

- Obici S, Feng Z, Arduini A, Conti R, Rossetti L (2003) Inhibition of hypothalamic carnitine palmitoyltransferase-1 decreases food intake and glucose production. *Nat Med* 9:756–761.
- Obici S, Feng Z, Morgan K, Stein D, Karkanias G, Rossetti L (2002) Central Administration of Oleic Acid Inhibits Glucose Production and Food Intake. :271–275.
- Oike H, Sakurai M, Ippoushi K, Kobori M (2015) Time-fixed feeding prevents obesity induced by chronic advances of light/dark cycles in mouse models of jet-lag/shift work. *Biochem Biophys Res Commun* 465:556–561 Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X15304496>.
- Oka Y, Takai Y, Touhara K (2009) Nasal airflow rate affects the sensitivity and pattern of glomerular odorant responses in the mouse olfactory bulb. *J Neurosci* 29:12070–12078.
- Ollmann MM, Lamoreux ML, Wilson BD, Barsh GS (1998) Interaction of Agouti protein with the melanocortin 1 receptor in vitro and in vivo. *Genes Dev* 12:316–330.
- Oomura Y, Ono T, Ooyama H, Wayner MJ (1969) Glucose and osmosensitive neurones of the rat hypothalamus. *Nature* 222:282–284.
- Pager J (1974) A selective modulation of the olfactory bulb electrical activity in relation to the learning of palatability in hungry and satiated rats. *Physiol Behav* 12:189–195.
- Pager J, Giachetti I, Holley A, Le Magnen J (1972) A selective control of olfactory bulb electrical activity in relation to food deprivation and satiety in rats. *Physiol Behav* 9:573–579.
- Pagotto U, Cervino C, Vicennati V, Marsicano G, Lutz B, Pasquali R (2006) How many sites of action for endocannabinoids to control energy metabolism? *Int J Obes (Lond)* 30 Suppl 1:S39–S43.
- Pain F, L’Heureux B, Gurden H (2011) Visualizing odor representation in the brain: A review of imaging techniques for the mapping of sensory activity in the olfactory glomeruli. *Cell Mol Life Sci* 68:2689–2709.
- Palouzier-paulignan B, Lacroix MC, Aimé P, Baly C, Caillol M, Congar P, Julliard a. K, Tucker K, Fadool DA (2012a) Olfaction under metabolic influences. *Chem Senses* 37:769–797.
- Palouzier-paulignan B, Lacroix MC, Aimé P, Baly C, Caillol M, Congar P, Julliard AK, Tucker K, Fadool DA (2012b) Olfaction under metabolic influences. *Chem Senses* 37:769–797.
- Pasquali R, Vicennati V, Cacciari M, Pagotto U (2006) The hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in obesity and the metabolic syndrome. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*, pp 111–128.
- Pautler RG (2004) In vivo, trans-synaptic tract-tracing utilizing manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI). *NMR Biomed* 17:595–601.
- Pautler RG, Koretsky AP (2002) Tracing odor-induced activation in the olfactory bulbs of mice using manganese-enhanced magnetic resonance imaging. *Neuroimage* 16:441–448.
- Pautler RG, Mongeau R, Jacobs RE (2003) In vivo trans-synaptic tract tracing from the murine striatum and amygdala utilizing manganese enhanced MRI (MEMRI). *Magn Reson Med* 50:33–39.
- Pautler RG, Silva AC, Koretsky AP (1998a) In vivo neuronal tract tracing using manganese-enhanced magnetic resonance imaging. *Magn Reson Med* 40:740–748.
- Pautler RG, Silva AC, Koretsky AP (1998b) In vivo neuronal tract tracing using manganese-enhanced magnetic resonance imaging. *Magn Reson Med* 40:740–748.
- Perez-Orive J, Mazor O, Turner GC, Cassenaer S, Wilson RI, Laurent G (2002) Oscillations and sparsening of odor representations in the mushroom body. *Science* 297:359–365.

- Peruzzo B, Pastor FE, Blázquez JL, Schöbitz K, Peláez B, Amat P, Rodríguez EM (2000) A second look at the barriers of the medial basal hypothalamus. *Exp Brain Res* 132:10–26.
- Pesaran B, Pezaris JS, Sahani M, Mitra PP, Andersen RA (2002) Temporal structure in neuronal activity during working memory in macaque parietal cortex. *Nat Neurosci* 5:805–811.
- Petzold GC, Hagiwara A, Murthy VN (2009) Serotonergic modulation of odor input to the mammalian olfactory bulb. *Nat Neurosci* 12:784–791.
- Pinching AJ, Powell TP (1971) The neuropil of the glomeruli of the olfactory bulb. *J Cell Sci* 9:347–377.
- Pírez N, Wachowiak M (2008) In vivo modulation of sensory input to the olfactory bulb by tonic and activity-dependent presynaptic inhibition of receptor neurons. *J Neurosci* 28:6360–6371.
- Pollock KE, Stevens D, Pennington K a., Thaisrivongs R, Kaiser J, Ellersieck MR, Miller DK, Schulz LC (2015) Hyperleptinemia during pregnancy decreases adult weight of offspring and is associated with increased offspring locomotor activity in mice. *Endocrinology* 156:en.2015–1247 Available at: <http://press.endocrine.org/doi/10.1210/en.2015-1247>.
- Porter J, Craven B, Khan RM, Chang S-J, Kang I, Judkewitz B, Volpe J, Settles G, Sobel N (2007) Mechanisms of scent-tracking in humans. *Nat Neurosci* 10:27–29.
- Powis JE, Bains JS, Ferguson a V (1998) Leptin depolarizes rat hypothalamic paraventricular nucleus neurons. *Am J Physiol* 274:R1468–R1472.
- Powley TL, Berthoud HR (1985) Diet and cephalic phase insulin responses. *Am J Clin Nutr* 42:991–1002.
- Prud'homme MJ, Lacroix MC, Badonnel K, Gougis S, Baly C, Salesse R, Caillol M (2009) Nutritional status modulates behavioural and olfactory bulb Fos responses to isoamyl acetate or food odour in rats: roles of orexins and leptin. *Neuroscience* 162:1287–1298.
- Raineki C, Pickenhagen A, Roth TL, Babstock DM, McLean JH, Harley CW, Lucion AB, Sullivan RM (2010) The neurobiology of infant maternal odor learning. *Brazilian J Med Biol Res Rev Bras Pesqui medicas e Biol Soc Bras Biofisica* 43:914–919.
- Rasmussen EB, Huskinson SL (2008) Effects of rimonabant on behavior maintained by progressive ratio schedules of sucrose reinforcement in obese Zucker (fa/fa) rats. *Behav Pharmacol* 19:735–742.
- Ravel N, Chabaud P, Martin C, Gaveau V, Hugues E, Tallon-Baudry C, Bertrand O, Gervais R (2003) Olfactory learning modifies the expression of odour-induced oscillatory responses in the gamma (60-90 Hz) and beta (15-40 Hz) bands in the rat olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 17:350–358.
- Ravel N, Pager J (1990) Respiratory patterning of the rat olfactory bulb unit activity: Nasal versus tracheal breathing. *Neurosci Lett* 115:213–218.
- Reisert J, Lai J, Yau K, Bradley J (2005) Mechanism of the excitatory Cl⁻ response in mouse olfactory receptor neurons. *Neuron* 45:553–561.
- Ricardo JA, Tongju Koh E (1978) Anatomical evidence of direct projections from the nucleus of the solitary tract to the hypothalamus, amygdala, and other forebrain structures in the rat. *Brain Res* 153:1–26.
- Rodriguez I, Feinstein P, Mombaerts P (1999) Variable patterns of axonal projections of sensory neurons in the mouse vomeronasal system. *Cell* 97:199–208.
- Rojas-Libano D, Kay LM (2012) Interplay between Sniffing and Odorant Sorptive Properties in the Rat. *J Neurosci* 32:15577–15589.
- Rojas-Libano D, Kay LM (2008a) Olfactory system gamma oscillations: The physiological dissection of a cognitive neural system. *Cogn Neurodyn* 2:179–194.

- Rojas-Libano D, Kay LM (2008b) Olfactory system gamma oscillations: the physiological dissection of a cognitive neural system. *Cogn Neurodyn* 2:179–194.
- Rolls ET (2005) Taste, olfactory, and food texture processing in the brain, and the control of food intake. *Physiol Behav* 85:45–56.
- Rosero MA, Aylwin ML (2011) Sniffing shapes the dynamics of olfactory bulb gamma oscillations in awake behaving rats. *Eur J Neurosci* 34:787–799.
- Roux SG, Cenier T, Garcia S, Litaudon P, Buonviso N (2007) A wavelet-based method for local phase extraction from a multi-frequency oscillatory signal. *J Neurosci Methods* 160:135–143.
- Roux SG, Garcia S, Bertrand B, Cenier T, Vigouroux M, Buonviso N, Litaudon P (2006) Respiratory cycle as time basis: an improved method for averaging olfactory neural events. *J Neurosci Methods* 152:173–178.
- Roy S, Zhang B, Lee VMY, Trojanowski JQ (2005) Axonal transport defects: A common theme in neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathol* 109:5–13.
- Rubin BD, Katz LC (1999) Optical imaging of odorant representations in the mammalian olfactory bulb. *Neuron* 23:499–511.
- Rubin BD, Katz LC (2001) Spatial coding of enantiomers in the rat olfactory bulb. *Nat Neurosci* 4:355–356.
- S. BOUNA, K. GYSLING ACASA (1994) Some Noradrenergic Neurons of Locus Ceruleus- Olfactory Pathways Contain Neuropeptide-Y. 34:413–417.
- Saito H, Chi Q, Zhuang H, Matsunami H, Mainland JD (2009) Odor coding by a Mammalian receptor repertoire. *Sci Signal* 2:ra9.
- Santamaria AB (2008) Manganese exposure, essentiality & toxicity. *Indian J Med Res* 128:484–500.
- Savigner A, Duchamp-Viret P, Grosmaître X, Chaput M, Garcia S, Ma M, Palouzier-Paulignan B (2009) Modulation of spontaneous and odorant-evoked activity of rat olfactory sensory neurons by two anorectic peptides, insulin and leptin. *J Neurophysiol* 101:2898–2906.
- Sawiak SJ, Picq JL, Dhenain M (2014) Voxel-based morphometry analyses of in vivo MRI in the aging mouse lemur primate. *Front Aging Neurosci* 6:82 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=24834052.
- Sawiak SJ, Wood NI, Williams GB, Morton AJ, Carpenter TA (2009) Voxel-based morphometry in the R6/2 transgenic mouse reveals differences between genotypes not seen with manual 2D morphometry. *Neurobiol Dis* 33:20–27 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18930824.
- Sawiak SJ, Wood NI, Williams GB, Morton AJ, Carpenter TA (2013) Voxel-based morphometry with templates and validation in a mouse model of Huntington’s disease. *Magn Reson Imaging* 31:1522–1531 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23835187.
- Scalia F, Winans SS (1975) The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. *J Comp Neurol* 161:31–55.
- Schiller J, Schiller Y, Stuart G, Sakmann B (1997) Calcium action potentials restricted to distal apical dendrites of rat neocortical pyramidal neurons. *J Physiol* 505:605–616.
- Schoenfeld TA, Cleland TA (2005) The anatomical logic of smell. *Trends Neurosci* 28:620–627.
- Schulz C, Paulus K, Lehnert H (2004) Central nervous and metabolic effects of intranasally applied leptin. *Endocrinology* 145:2696–2701.

- Schwartz MW, Baskin DG, Kaiyala KJ, Woods SC (1999) Model for the regulation of energy balance and adiposity by the central nervous system. *Am J Clin Nutr* 69:584–596.
- Schwartz MW, Porte D (2005) Diabetes, obesity, and the brain. *Science* 307:375–379.
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Seeley RJ, Baskin DG (2000) Central nervous system control of food intake. *Nature* 404:661–671.
- Schwob JE (2002) Neural regeneration and the peripheral olfactory system. *Anat Rec* 269:33–49.
- Sclafani A, Ackroff K (1994) Glucose- and fructose-conditioned flavor preferences in rats: Taste versus postingestive conditioning. *Physiol Behav* 56:399–405.
- Scott JW (2006) Sniffing and spatiotemporal coding in olfaction. *Chem Senses* 31:119–130.
- Sell CS (2006) On the unpredictability of odor. *Angew Chemie - Int Ed* 45:6254–6261.
- Sepúlveda MR, Dresselaers T, Vangheluwe P, Everaerts W, Himmelreich U, Mata a. M, Wuytack F (2012) Evaluation of manganese uptake and toxicity in mouse brain during continuous MnCl₂ administration using osmotic pumps. *Contrast Media Mol Imaging* 7:426–434.
- Sharp FR, Kauer JS, Shepherd GM (1975) Local sites of activity-related glucose metabolism in rat olfactory bulb during olfactory stimulation. *Brain Res* 98:596–600.
- Shepherd GM (2004) The human sense of smell: Are we better than we think? *PLoS Biol* 2:572–575.
- Shepherd GM, Chen WR, Willhite D, Migliore M, Greer CA (2007) The olfactory granule cell: From classical enigma to central role in olfactory processing. *Brain Res Rev* 55:373–382.
- Shingo T, Gregg C, Enwere E, Fujikawa H, Hassam R, Geary C, Cross JC, Weiss S (2003) Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin. *Science* 299:117–120.
- Shipley MT, Halloran FJ, De La Torre J (1985) Surprisingly rich projection from locus coeruleus to the olfactory bulb in the rat. *Brain Res* 329:294–299.
- Shiraishi T, Sasaki K, Nijima A, Oomura Y (1999) Leptin effects on feeding-related hypothalamic and peripheral neuronal activities in normal and obese rats. *Nutr Burbank Los Angeles Cty Calif* 15:576–579.
- Silva AC (2012) Using manganese-enhanced MRI to understand BOLD. *Neuroimage* 62:1009–1013.
- Silva AC, Lee JH, Aoki I, Koretsky AP (2004) Manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI): Methodological and practical considerations. *NMR Biomed* 17:532–543.
- Simpson KA, Martin NM, Bloom SR (2009) Hypothalamic regulation of food intake and clinical therapeutic applications. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 53:120–128.
- Singer W (1993a) Neuronal representations, assemblies and temporal coherence. *Prog Brain Res* 95:461–474.
- Singer W (1993b) Synchronization of cortical activity and its putative role in information processing and *Annu Rev Physiol* Available at:
<http://arjournals.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.ph.55.030193.002025\papers2://publication/uuid/EDAD966E-64ED-4FD3-90EA-7E458CEC47A3>.
- Singer W (2009) Distributed processing and temporal codes in neuronal networks. *Cogn Neurodyn* 3:189–196.
- Small DM (2012) Flavor is in the brain. *Physiol Behav* 107:540–552 Available at:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.04.011>.

- Smith KDB, Kallhoff V, Zheng H, Pautler RG (2007) In vivo axonal transport rates decrease in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroimage* 35:1401–1408.
- Sokoloff L, Reivich M, Kennedy C, Des Rosiers MH, Patlak CS, Pettigrew KD, Sakurada O, Shinohara M (1977) The [¹⁴C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: Theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *J Neurochem* 28:897–916.
- Solinas M, Goldberg SR (2005) Motivational effects of cannabinoids and opioids on food reinforcement depend on simultaneous activation of cannabinoid and opioid systems. *Neuropsychopharmacology* 30:2035–2045.
- Sorge RE et al. (2014) Olfactory exposure to males, including men, causes stress and related analgesia in rodents. *Nat Methods* 11:629–632 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24776635>.
- Soria-Gomez E, Bellocchio L, Marsicano G (2014) New insights on food intake control by olfactory processes: The emerging role of the endocannabinoid system. *Mol Cell Endocrinol* 397:59–66 Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0303720714003037>.
- Soucy ER, Albeanu DF, Fantana AL, Murthy VN, Meister M (2009) Precision and diversity in an odor map on the olfactory bulb. *Nat Neurosci* 12:210–220.
- Spanswick D, Smith M a, Groppi VE, Logan SD, Ashford ML (1997) Leptin inhibits hypothalamic neurons by activation of ATP-sensitive potassium channels. *Nature* 390:521–525.
- Spors H, Grinvald A (2002) Spatio-temporal dynamics of odor representations in the mammalian olfactory bulb. *Neuron* 34:301–315.
- Spors H, Wachowiak M, Cohen LB, Friedrich RW (2006) Temporal dynamics and latency patterns of receptor neuron input to the olfactory bulb. *J Neurosci* 26:1247–1259.
- Stevens GA, Singh GM, Lu Y, Danaei G, Lin JK, Finucane MM, Bahalim AN, McIntire RK, Gutierrez HR, Cowan M, Paciorek CJ, Farzadfar F, Riley L, Ezzati M (2012) National, regional, and global trends in adult overweight and obesity prevalences. *Popul Health Metr* 10:22 Available at: <http://www.pophealthmetrics.com/content/10/1/22>.
- Stewart WB, Kauer JS, Shepherd GM (1979) Functional organization of rat olfactory bulb analysed by the 2-deoxyglucose method. *J Comp Neurol* 185:715–734 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/447878>.
- Suárez J, Ortíz O, Puente N, Bermúdez-Silva FJ, Blanco E, Fernández-Llebrez P, Grandes P, de Fonseca FR, Moratalla R (2011) Distribution of diacylglycerol lipase alpha, an endocannabinoid synthesizing enzyme, in the rat forebrain. *Neuroscience*.
- Sullivan RM, Stackenwalt G, Nasr F, Lemon C, Wilson DA (2000) Association of an odor with activation of olfactory bulb noradrenergic beta-receptors or locus coeruleus stimulation is sufficient to produce learned approach responses to that odor in neonatal rats. *Behav Neurosci* 114:957–962.
- Sultan-Styne K, Toledo R, Walker C, Kallkopf A, Ribak CE, Guthrie KM (2009) Long-term survival of olfactory sensory neurons after target depletion. *J Comp Neurol* 515:696–710 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2728470&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Suzuki K, Simpson K a, Minnion JS, Shillito JC, Bloom SR (2010) The role of gut hormones and the hypothalamus in appetite regulation. *Endocr J* 57:359–372.
- Suzuki Y (2004) Fine structural aspects of apoptosis in the olfactory epithelium. *J Neurocytol* 33:693–702 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16217624>.
- Szollasi A, Nenquin M, Aguilar-Bryan L, Bryan J, Henquin J-C (2007) Glucose stimulates Ca²⁺ influx and insulin secretion in 2-week-old beta-cells lacking ATP-sensitive K⁺ channels. *J Biol Chem* 282:1747–1756.
- Tallon-Baudry C, Bertrand O (1999) Oscillatory gamma activity in humans and its role in object representation. *Trends Cogn Sci* 3:151–162.

- Tao YX (2005) Molecular mechanisms of the neural melanocortin receptor dysfunction in severe early onset obesity. *Mol Cell Endocrinol* 239:1–14.
- Tegoni M, Pelosi P, Vincent F, Spinelli S, Campanacci V, Grolli S, Ramoni R, Cambillau C (2000) Mammalian odorant binding proteins. *Biochim Biophys Acta - Protein Struct Mol Enzymol* 1482:229–240.
- Thanos PK, Robison LS, Robinson JK, Michaelides M, Wang GJ, Volkow ND (2013) Obese rats with deficient leptin signaling exhibit heightened sensitivity to olfactory food cues. *Synapse* 67:171–178.
- Thiebaud N, Johnson MC, Butler JL, Bell G a, Ferguson KL, Fadool AR, Fadool JC, Gale AM, Gale DS, Fadool D a (2014) Hyperlipidemic diet causes loss of olfactory sensory neurons, reduces olfactory discrimination, and disrupts odor-reversal learning. *J Neurosci* 34:6970–6984 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24828650>.
- Thomas-Danguin T, Sinding C, Romagny S, El Mountassir F, Atanasova B, Le Berre E, Le Bon A-M, Coureaud G (2014) The perception of odor objects in everyday life: a review on the processing of odor mixtures. *Front Psychol* 5:504 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4040494&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Thomsen K, Offenhauser N, Lauritzen M (2004) Principal neuron spiking: neither necessary nor sufficient for cerebral blood flow in rat cerebellum. *J Physiol* 560:181–189.
- Thorne RG, Pronk GJ, Padmanabhan V, Frey WH (2004) Delivery of insulin-like growth factor-I to the rat brain and spinal cord along olfactory and trigeminal pathways following intranasal administration. *Neuroscience* 127:481–496.
- Thyssen A, Hirnet D, Wolburg H, Schmalzing G, Deitmer JW, Lohr C (2010) Ectopic vesicular neurotransmitter release along sensory axons mediates neurovascular coupling via glial calcium signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:15258–15263.
- Tong J, Mannea E, Aimé P, Pfluger PT, Yi C-X, Castaneda TR, Davis HW, Ren X, Pixley S, Benoit S, Julliard K, Woods SC, Horvath TL, Sleeman MM, D'Alessio D, Obici S, Frank R, Tschöp MH (2011) Ghrelin enhances olfactory sensitivity and exploratory sniffing in rodents and humans. *J Neurosci* 31:5841–5846.
- Trevelyan AJ (2009) The direct relationship between inhibitory currents and local field potentials. *J Neurosci* 29:15299–15307.
- Uchida N, Mainen ZF (2003) Speed and accuracy of olfactory discrimination in the rat. *Nat Neurosci* 6:1224–1229.
- Uchida N, Takahashi YK, Tanifuji M, Mori K (2000) Odor maps in the mammalian olfactory bulb: domain organization and odorant structural features. *Nat Neurosci* 3:1035–1043.
- Ueno M, Dobrogowska DH, Vorbrodt AW (1996) Immunocytochemical evaluation of the blood-brain barrier to endogenous albumin in the olfactory bulb and pons of senescence-accelerated mice (SAM). *Histochem Cell Biol* 105:203–212 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8681038.
- Uhlhaas PJ, Singer W (2010) Abnormal neural oscillations and synchrony in schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 11:100–113.
- Unger J, McNeill TH, Moxley RT, White M, Moss A, Livingston JN (1989) Distribution of insulin receptor-like immunoreactivity in the rat forebrain. *Neuroscience* 31:143–157.
- Urayama A, Banks WA (2008) Starvation and triglycerides reverse the obesity-induced impairment of insulin transport at the blood-brain barrier. *Endocrinology* 149:3592–3597.
- Van Driel KS, Talling JC (2005) Familiarity increases consistency in animal tests. *Behav Brain Res* 159:243–245.
- Vanderwolf CH, Zibrowski EM, Wakarchuk D (2002) The ability of various chemicals to elicit olfactory ??-waves in the pyriform cortex of meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*) and laboratory rats (*Rattus norvegicus*). *Brain Res* 924:151–158.

- VanItallie TB (2006) Sleep and energy balance: interactive homeostatic systems. *Metabolism* 55.
- Verhagen LAW, Egecioglu E, Luijendijk MCM, Hillebrand JJG, Adan RAH, Dickson SL (2011) Acute and chronic suppression of the central ghrelin signaling system reveals a role in food anticipatory activity. *Eur Neuropsychopharmacol* 21:384–392.
- Verhagen J V, Wesson DW, Netoff TI, White JA, Wachowiak M (2007) Sniffing controls an adaptive filter of sensory input to the olfactory bulb. *Nat Neurosci* 10:631–639.
- Veyrac A, Sacquet J, Nguyen V, Marien M, Jourdan F, Didier A (2009) Novelty determines the effects of olfactory enrichment on memory and neurogenesis through noradrenergic mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 34:786–795.
- Vincis R, Gschwend O, Bhaukaurally K, Beroud J, Carleton A (2012) Dense representation of natural odorants in the mouse olfactory bulb. *Nat Neurosci* 15:537–539.
- Vincis R, Lagier S, Van De Ville D, Rodriguez I, Carleton A (2015) Sensory-Evoked Intrinsic Imaging Signals in the Olfactory Bulb Are Independent of Neurovascular Coupling. *Cell Rep*:1–13 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26146075>.
- Vucinic D, Cohen LB, Kosmidis EK (2006) Interglomerular center-surround inhibition shapes odorant-evoked input to the mouse olfactory bulb in vivo. *J Neurophysiol* 95:1881–1887 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16319205>.
- Wachowiak M, Cohen LB (1999) Presynaptic inhibition of primary olfactory afferents mediated by different mechanisms in lobster and turtle. *J Neurosci* 19:8808–8817.
- Wachowiak M, Cohen LB (2001) Representation of odorants by receptor neuron input to the mouse olfactory bulb. *Neuron* 32:723–735.
- Wachowiak M, Cohen LB (2003) Correspondence between odorant-evoked patterns of receptor neuron input and intrinsic optical signals in the mouse olfactory bulb. *J Neurophysiol* 89:1623–1639.
- Wachowiak M, Economo MN, Díaz-Quesada M, Brunert D, Wesson DW, White JA, Rothermel M (2013) Optical dissection of odor information processing in vivo using GCaMPs expressed in specified cell types of the olfactory bulb. *Ann Intern Med* 158:5285–8300.
- Wachowiak M, McGann JP, Heyward PM, Shao Z, Puche AC, Shipley MT (2005) Inhibition [corrected] of olfactory receptor neuron input to olfactory bulb glomeruli mediated by suppression of presynaptic calcium influx. *J Neurophysiol* 94:2700–2712.
- Wagner S, Gresser AL, Torello AT, Dulac C (2006) A Multireceptor Genetic Approach Uncovers an Ordered Integration of VNO Sensory Inputs in the Accessory Olfactory Bulb. *Neuron* 50:697–709.
- Wang B, Chandrasekera PC, Pippin JJ (2014) Leptin- and Leptin Receptor-Deficient Rodent Models: Relevance for Human Type 2 Diabetes. *Curr Diabetes Rev*:131–145 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24809394>.
- Wang L, Saint-Pierre DH, Taché Y (2002) Peripheral ghrelin selectively increases Fos expression in neuropeptide Y - synthesizing neurons in mouse hypothalamic arcuate nucleus. *Neurosci Lett* 325:47–51.
- Wang R, Cruciani-Guglielmacci C, Migrenne S, Magnan C, Cotero VE, Routh VH (2006) Effects of oleic acid on distinct populations of neurons in the hypothalamic arcuate nucleus are dependent on extracellular glucose levels. *J Neurophysiol* 95:1491–1498.
- Wellendorph P, Johansen LD, Bräuner-Osborne H (2009) Molecular pharmacology of promiscuous seven transmembrane receptors sensing organic nutrients. *Mol Pharmacol* 76:453–465.
- Wells WM, Viola P, Atsumi H, Nakajima S, Kikinis R (1996) Multi-modal volume registration by maximization of mutual information.

- Whitman MC, Greer CA (2007) Synaptic integration of adult-generated olfactory bulb granule cells: basal axodendritic centrifugal input precedes apical dendrodendritic local circuits. *J Neurosci* 27:9951–9961.
- Whitman MC, Greer CA (2009) Adult neurogenesis and the olfactory system. *Prog Neurobiol* 89:162–175.
- Whittaker J, Sørensen H, Gadsbøll VL, Hinrichsen J (2002) Comparison of the functional insulin binding epitopes of the A and B isoforms of the insulin receptor. *J Biol Chem* 277:47380–47384.
- Widerøe M, Olsen Ø, Pedersen TB, Goa PE, Kavelaars A, Heijnen C, Skranes J, Brubakk A-M, Brekken C (2009) Manganese-enhanced magnetic resonance imaging of hypoxic-ischemic brain injury in the neonatal rat. *Neuroimage* 45:880–890 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19138750>.
- Williams KA, Magnuson M, Majeed W, LaConte SM, Peltier SJ, Hu X, Keilholz SD (2010) Comparison of α -chloralose, medetomidine and isoflurane anesthesia for functional connectivity mapping in the rat. *Magn Reson Imaging* 28:995–1003.
- Wilson D a, Stevenson RJ (2003) Olfactory perceptual learning: the critical role of memory in odor discrimination. *Neurosci Biobehav Rev* 27:307–328 Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149763403000502>.
- Wilson D a., Sullivan RM (2011) Cortical processing of odor objects. *Neuron* 72:506–519 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2011.10.027>.
- Winner B, Cooper-Kuhn CM, Aigner R, Winkler J, Kuhn HG (2002) Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 16:1681–1689 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12431220> <http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1046/j.1460-9568.2002.02238.x/asset/j.1460-9568.2002.02238.x.pdf?v=1&t=gt5b7gfe&s=0b23b7536acf23ad1ea6f4c8789615dbcf9fa486>.
- Woods SC (2005) Signals that influence food intake and body weight. *Physiol Behav* 86:709–716.
- Woods SC, D'Alessio D a (2008) Central control of body weight and appetite. *J Clin Endocrinol Metab* 93:S37–S50.
- Woods SC, Seeley RJ, Porte Jr. D, Schwartz MW (1998) Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science* (80-) 280:1378–1383 Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9603721.
- Wortley KE, Del Rincon JP, Murray JD, Garcia K, Iida K, Thorner MO, Sleeman MW (2005) Absence of ghrelin protects against early-onset obesity. *J Clin Invest* 115:3573–3578.
- Xu F, Greer CA, Shepherd GM (2000) Odor maps in the olfactory bulb. *J Comp Neurol* 422:489–495.
- Yamaguchi M, Manabe H, Murata K, Mori K (2013) Reorganization of neuronal circuits of the central olfactory system during postprandial sleep. *Front Neural Circuits* 7:132 Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3743305&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Yang X, Renken R, Hyder F, Siddeek M, Greer CA, Shepherd GM, Shulman RG (1998a) Dynamic mapping at the laminar level of odor-elicited responses in rat olfactory bulb by functional MRI. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7715–7720.
- Yang X, Renken R, Hyder F, Siddeek M, Greer CA, Shepherd GM, Shulman RG (1998b) Dynamic mapping at the laminar level of odor-elicited responses in rat olfactory bulb by functional MRI. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7715–7720.
- Yazdi FT, Clee SM, Meyre D (2015) Obesity genetics in mouse and human: back and forth, and back again. *PeerJ* 3:e856 Available at: <https://peerj.com/articles/856>.
- Yeomans MR (2006) Olfactory influences on appetite and satiety in humans. *Physiol Behav* 89:10–14.
- Yokoyama TK, Mochimaru D, Murata K, Manabe H, Kobayakawa K, Kobayakawa R, Sakano H, Mori K, Yamaguchi M (2011) Elimination of adult-born neurons in the olfactory bulb is promoted during the postprandial period. *Neuron* 71:883–897.

- Yu JH, Kim MS (2012) Molecular mechanisms of appetite regulation. *Diabetes Metab J* 36:391–398.
- Yu X, Sanes DH, Aristizabal O, Wadghiri YZ, Turnbull DH (2007) Large-scale reorganization of the tonotopic map in mouse auditory midbrain revealed by MRI. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:12193–12198.
- Yu X, Wadghiri YZ, Sanes DH, Turnbull DH (2005) In vivo auditory brain mapping in mice with Mn-enhanced MRI. *Nat Neurosci* 8:961–968.
- Yu X, Zou J, Babb JS, Johnson G, Sanes DH, Turnbull DH (2008) Statistical mapping of sound-evoked activity in the mouse auditory midbrain using Mn-enhanced MRI. *Neuroimage* 39:223–230.
- Zac-Varghese S (2011) Hormonal Interactions Between Gut and Brain. *Brain*:1–7.
- Zac-Varghese S, Tan T, Bloom SR (2010) Hormonal interactions between gut and brain. *Discov Med* 10:543–552.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425–432.
- Zibrowski EM, Vanderwolf CH (1997) Oscillatory fast wave activity in the rat pyriform cortex: relations to olfaction and behavior. *Brain Res* 766:39–49.
- Zierath JR, Ryder JW, Doebber T, Woods J, Wu M, Ventre J, Li Z, Mccrary C, Berger J, Zhang B, Moller DE (1998) Role of skeletal muscle in thiazolidinedione insulin sensitizer (PPAR?? agonist) action. *Endocrinology* 139:5034–5041.
- Zigman JM, Nakano Y, Coppari R, Balthasar N, Marcus JN, Lee CE, Jones JE, Deysher AE, Waxman AR, White RD, Williams TD, Lachey JL, Seeley RJ, Lowell BB, Elmquist JK (2005) Mice lacking ghrelin receptors resist the development of diet-induced obesity. *J Clin Invest* 115:3564–3572.

Index des figures

Figure 1.1 Les molécules odorantes diffèrent par de nombreuses caractéristiques chimiques	18
Figure 1.2 Vue anatomique de la MO et de ses connexions au BO	22
Figure 1.3 Organisation Synaptique au sein du BO.	30
Figure 1.4 Les principales voies neuronales ascendantes du système olfactif des mammifères.	32
Tableau 1.1. Résolution spatiotemporelles et propriétés des techniques d'imagerie utilisées pour la cartographie des cartes spatiales dans le BO in vivo.	34
Figure 1.5 Cartes d'activation spatiale du BO visualisées avec différentes techniques se basant sur des signaux endogènes liés au métabolisme énergétique.	41
Tableau 1.2 Paramètres des principaux enregistrements MEMRI dans le système olfactif.	44
Figure 1.6 Dynamique temporelle des cartes d'activation visualisée par imagerie calcique des OSN.	52
Figure 1.7 Réponses oscillatoires pour différents odorants chez le rat anesthésié.	63
Figure 1.8 La stimulation olfactive modifie les oscillations bêta (15-35Hz) et gamma (60-60Hz) dans le BO.	65
Figure 1.9 Interactions entre les noyaux et les systèmes neuropeptidergiques dans l'hypothalamus.	75
Figure 1.10 Représentation schématique des composants et des flux d'informations majeurs des systèmes centraux et périphériques impliqués dans la régulation de la balance énergétique et de la prise alimentaire.	77
Figure 1.11 Représentation schématique de l'expression des récepteurs aux facteurs majeurs du métabolisme au sein du système olfactif.	94
Figure 1.12 Modulation du BO par voie hormonale et nutritive..	95
Figure 1.13 Représentation schématique des interactions entre système olfactif, système de régulation de la prise alimentaire et obésité.	103
Figure 2.1 Composition de la nourriture standard (site internet du fabricant Safe).	107
Figure 2.2. Composition détaillée de la nourriture 235HF (site internet du fabricant Safe).	108
Figure 2.3. Composition détaillée de la nourriture 230HF (site internet du fabricant Safe).	108
Figure 2.4. Prise de vue des deux caméras, l'une de face à gauche et l'autre de biais à droite, de l'activité d'exploration spontanée.	113
Figure 2.5 Dispositif expérimental d'imagerie optique in vivo et séquences d'acquisition.	123
Figure 2.6. Principe de la tâche de discrimination olfactive de type Go/No Go	129
Figure 2.7. Souris obèse effectuant la tâche de discrimination olfactive.	129

Figure 3.1. Comparatif de l'évolution du poids de souris C57BL6 maintenues sous régime standard 'témoins', n= 4) et de souris C57BL6 ayant reçues un régime 230HF (DIO, n= 12) pendant 14 semaines.	138
Figure 3.2 Déplacements comptabilisés sur un cycle de 24h à jeun chez des souris nourries.	139
Figure 3.3. Imagerie optique de l'activation glomérulaire du BO.	141
Figure 3.4. Test d'exploration de l'odeur d'amande associée à la nourriture (A) et odeur d'orange connue mais non associée à de la nourriture (B) chez les souris ob/ob et témoins nourries et témoins à jeun.	142
Figure 3.5 Test d'exploration de l'odeur de pentyl acétate, odeur nouvelle jamais rencontrée, chez les souris témoins nourries et à jeun et chez les souris ob/ob nourries.	143
Figure 3.6. Test d'exploration de l'odeur d'amande associée à la nourriture (A) et odeur d'orange connue mais non associée à de la nourriture (B) chez les souris DIO et témoins à jeun.	144
Figure 3.7. Test d'exploration de la pâte odorisée versus non odorisée chez les souris ob/ob et témoins.	146
Figure 3.8 Test d'exploration de la pâte odorisée versus non odorisée chez les souris DIO et témoins.	147
Figure 3.9 Visualisation du BO de souris témoin par IRM, sans injection de manganèse.	148
Figure 3.10 : Localisation du signal MEMRI dans le BO.	148
Figure 3.11. : Dynamique temporelle du MEMRI chez des souris stimulées avec de l'air.	150
Figure 3.12. Images représentatives de la distribution brute d'activité obtenues par MEMRI (analyse manuelle par Image J).	151
Figure 3.13. : Histogramme indiquant la somme des pixels activés sur l'ensemble des coupes étudiées pour chaque groupe	152
Figure 3.14 Test 1. Comparaison intragroupe de l'activité entre souris témoins stimulées avec 5% d'amande contre des souris témoins stimulées avec de l'air.	154
Figure 3.15 Test 2. Comparaison intergroupe de l'activité entre souris ob/ob stimulées avec de l'air contre des souris témoins stimulées avec de l'air.	155
Figure 3.16 Test 3. Comparaison intergroupe de l'activité entre souris ob/ob stimulées avec de l'amande à 5% contre des souris témoins stimulées avec de l'amande à 5%.	156
Figure 3.17 Test 4. Comparaison intragroupe de l'activité entre souris ob/ob stimulées avec 5% d'amande contre des ob/ob stimulées avec de l'air.	157
Figure 3.18 Test 5. Comparaison intragroupe de l'activité entre souris ob/ob stimulées avec de l'air et ayant reçu de la leptine contre des souris ob/ob stimulées avec de l'air.	158
Figure 3.19 : Test 5 inverse. Comparaison intragroupe de l'activité entre souris ob/ob stimulées avec de l'air contre des souris ob/ob stimulées avec de l'air et ayant reçu de la leptine.	158
Figure 3. 20 : Test 6. Comparaison intragroupe de l'activité entre souris ob/ob stimulées avec 5% d'amande et ayant reçu de la leptine contre des souris ob/ob stimulées avec 5% d'amande.	159
Figure 3.21 Test 6 inverse. Comparaison intragroupe de l'activité entre souris ob/ob stimulées avec 5% d'amande contre des souris ob/ob stimulées avec 5% d'amande et ayant reçu de la leptine.	160

Figure 3.22 Test 7. Comparaison intergroupe de l'activité entre souris ob/ob stimulées avec 5% d'amande et ayant reçu de la leptine contre des souris témoins stimulées avec 5% d'amande.	161
Figure 3.23 Test 8. Comparaison intragroupe de l'activité entre souris témoins stimulées avec 5% de pentylacétate contre des souris témoins stimulées avec de l'air.	162
Figure 3.24 Test 9. Comparaison intragroupe de l'activité entre souris ob/ob stimulées avec 5% de pentylacétate contre des souris ob/ob stimulées avec de l'air.	163
Figure 3.25. Test 10. Comparaison intergroupe de l'activité entre souris témoins stimulées avec 5% de pentylacétate contre des souris ob/ob stimulées avec 5% de pentylacétate.	163
Figure 3.26. Test 11. Comparaison intragroupe de l'activité entre souris ob/ob stimulées avec 5% d'amande et ayant reçu des boulettes odorisées à l'amande contre des souris ob/ob stimulées avec 5% d'amande et n'ayant jamais été exposées à l'amande auparavant.	164
Tableau 3.1 Récapitulatif des différents tests réalisés avec SPM.	165
Figure 3.27. Schéma récapitulant la localisation des zones de sensibilité à l'odeur et à la leptine dans le BO de souris.	166
Figure 3.28. Marquage au BrDU indiquant la survie des néoneurones dans le BO.	167
Figure 3.29 Immunomarquage au Ki67 indiquant le taux de prolifération des nouveaux neurones dans la SVZ.	167
Figure 3.30: Courbes illustrant la motivation des souris	169
Figure 3.31 Comparaison des courbes d'apprentissage des animaux du groupe 1	170
Figure 3.32 : Comparaison des courbes d'apprentissage des animaux du groupe 2	171
Figure 3.33. Comparaison des courbes d'apprentissage des animaux du groupe 3	172
Figure 3.34 Moyenne de la puissance des pavés temps-fréquence des oscillations bêta par groupe et par Go/NoGo (Débutants)	176
Figure 3.35 Moyenne de la puissance des pavés temps-fréquence des oscillations bêta par groupe et par Go/NoGo (Experts)	178
Figure 3.36 : Moyenne de la puissance des pavés temps-fréquence des oscillations gamma par groupe et par Go/NoGo (Débutants).	179
Figure 3.37 : Moyenne de la puissance des pavés temps-fréquence des oscillations gamma par groupe et par Go/NoGo (experts).	180
Figure 4.1 : Représentation schématique de la variation des signaux MEMRI et de leurs bases cellulaires étudiées pendant la thèse.	198

Liste des présentations orales et affichées pendant la thèse

2013 : Présentation d'un poster au colloque national de la Société des Neurosciences Françaises de Lyon : **Plasticity in the main olfactory bulb of leptin-deficient ob/ob obese mice**

2013 : Présentation orale au colloque de cloture de l'IFR 144, Neurosud Paris : **Plasticity in the olfactory bulb of fasted and obese rodents**

2014 : Présentation orale au colloque GDR Neuromem de Grasse : **Plasticity in the olfactory bulb of obese rodents**

2014: Présentation d'un poster au colloque international Neuroscience 2014 organisé par la Society for Neuroscience à Washington, DC : **Olfactory-feeding crosstalk: Probing plasticity in the olfactory bulb of obese mice by Manganese-Enhanced MRI**

2015: Présentation orale aux journées de l'Ecole Doctorale Biosigne (ED 419): **Olfactory-feeding crosstalk: Probing plasticity in the olfactory bulb of obese mice by Manganese-Enhanced MRI**

2015: Présentation d'un poster au colloque national de la Société des Neurosciences Françaises de Montpellier : **Profound changes in olfactory coding in leptin deficient ob/ob mice**

Liste des missions doctorales

2012-2014 : Mission de médiateur scientifique : rédacteur au sein du journal Paris-Sud Magazine, magazine d'information officiel de l'Université Paris-Sud.

2014-2015 : Mission de médiateur scie

Titre : Interactions olfacto-alimentaires : étude fonctionnelle de la plasticité du système olfactif chez deux modèles murins de l'obésité

Mots clés : Olfaction ; Obésité ; Prise alimentaire ; Leptine ; Imagerie ; Oscillations

La compréhension des mécanismes cérébraux régulant la prise alimentaire est devenue cruciale face à la pandémie mondiale d'obésité. L'ingestion d'aliments est sous le contrôle d'un large réseau de structures cérébrales, dont l'hypothalamus, le système limbique et les systèmes sensoriels, qui régulent la balance énergétique en régulant l'apport de nourriture et la dépense énergétique. Étant donné l'importance de l'olfaction dans l'appréciation des aliments, il est primordial d'identifier des mécanismes précis liant olfaction et nutrition.

Chez les mammifères, le système olfactif est vital pour les comportements de survie, notamment pour la détection de la nourriture et l'appréciation de sa qualité. Nous avons choisi d'étudier l'activité dans le Bulbe Olfactif principal (BO), la première structure cérébrale qui permet la représentation spatiotemporelle des odeurs. De façon intéressante, des récepteurs aux hormones anorexigènes (leptine, insuline) et orexigènes (ghréline) sont exprimés à la fois dans l'hypothalamus et le BO. En particulier, il a été montré que la leptine diminuait l'expression du marqueur d'activité c-fos dans les cellules du BO chez des animaux à jeun en réponse à une odeur alimentaire. Toutefois, l'impact de la leptine (et de l'obésité) sur l'activité du BO *in vivo* demeure inconnu.

Pour évaluer l'action de la leptine et de l'obésité sur la plasticité olfactive, nous avons choisi le modèle murin ob/ob. Dans cette souche, le gène ob qui permet la synthèse de leptine est inactif, ce qui déclenche une hyperphagie et une obésité précoce. Nous avons d'abord décrit la répartition spatiale de l'activité dans le BO en réponse à une odeur alimentaire et à une odeur neutre chez ces souris en les comparant à des souris témoins grâce une technique de neuroimagerie fonctionnelle, l'Imagerie par Résonance Magnétique renforcée au Manganèse (MEMRI). Par le développement d'une méthode de comparaison statistique indépendant de l'utilisateur, le SPM (Statistical Parametric Mapping), nous avons mis en évidence une augmentation de l'activité spontanée et de l'activité induite par odeur alimentaire dans le BO des ob/ob. Cependant, l'activité induite par une odeur neutre n'était pas plus élevée. L'injection de leptine a pour résultat d'augmenter le signal MEMRI dans les couches profondes du BO et ne restaure que partiellement l'activité des ob/ob.

Nous avons alors voulu décrire les changements anatomofonctionnels dans les circuits du BO chez ces souris en quantifiant l'expression de marqueurs cellulaires par RT-PCR, mais nous n'avons pas trouvé de différence significative entre ob/ob et les témoins. Néanmoins, en quantifiant la neurogenèse dans le BO par injections de BrdU, nous avons mis en évidence une survie accrue des cellules granulaires et péragglomerales chez les ob/ob, ce qui suggère une action régulatrice de la leptine sur l'élimination des neurones néoformés.

Pour évaluer la dynamique temporelle de l'activité du BO, nous avons enregistré par électrophysiologie les variations de l'activité oscillatoire du potentiel de champ local dans les couches profondes du BO pendant l'apprentissage d'une tâche de discrimination olfactive, le Go/NoGo. L'apparition d'une oscillation lente dite bêta (15-40 Hz) pendant cet apprentissage est un marqueur fonctionnel de l'état du réseau olfactif. Elle est dépendante des retours centrifuges provenant du cortex olfactif, majoritairement du cortex piriforme. Si nous n'avons pas observé de différence importante dans la discrimination olfactive, nous avons en revanche mis en évidence un problème motivationnel chez les animaux ob/ob, qui n'effectuaient la tâche que si la récompense hydrique contenait du sucre. Nos enregistrements montrent une forte augmentation des oscillations bêta chez les souris obèses après apprentissage comparé aux souris témoins.

L'ensemble des données obtenues pendant cette thèse ont permis de mieux décrire de façon intégrée les mécanismes olfactifs dans le BO dans le contexte de l'obésité. La conjonction de techniques complémentaires, notamment en imagerie, électrophysiologie et comportement, nous a permis de mieux comprendre la modulation du fonctionnement du BO dans le cadre de l'obésité et du rôle de la leptine dans ces conditions.

Title : Olfactory-feeding crosstalk: describing the profound changes in the spatiotemporal representation of odors in the main olfactory bulb of obese mice.

Keywords : Olfaction ; Obesity ; Food Intake ; Leptin ; Imaging ; Oscillations

Olfaction makes possible both the detection and the processing of odors related to food location and palatability. Interestingly, receptors to anorexigen and orexigen hormones and neuropeptides found in the hypothalamus are also expressed in the main olfactory bulb (MOB), suggesting that feeding state has an impact on odor representation. However, neuronal mechanisms linking olfaction, food intake and metabolic disorders are still unclear.

In this PhD thesis, we wanted to further understand mechanisms of the olfactory-feeding crosstalk and tested the effects of obesity on olfactory activity in the MOB. Leptin, a peptidergic hormone produced by adipocytes, is a major regulator of the energy balance and inhibits food intake. Ob/ob mice are deficient in leptin from birth and are widely used as a murine model of obesity since they are hyperphagic and become rapidly obese. We used a functional neuroimaging technique, Manganese Enhanced Magnetic Resonance Imaging (MEMRI), in association with statistical parametric mapping (SPM) to monitor food odor-evoked spatial activity in the MOB of these mice. Manganese is a paramagnetic ion that is an analog of calcium. It was previously shown to accumulate in specific regions of MOB activated by odorants. It also has the great advantage on other imaging techniques to make possible the follow-up of image spontaneous activity.

Using MEMRI, we found that odor-evoked signal is different, both in terms of intensity and localization between lean and ob/ob mice for the spontaneous activity and in response to food odor. However, this is not the case for a neutral odor. Moreover, leptin impacts both spontaneous activity and food odor-evoked signal intensity in both groups. Interestingly leptin strongly activates deep layers (mitral cell layer and mainly granule cell layer) of the MOB. To pinpoint what cellular/molecular mechanisms can be responsible for these changes in the spatial distribution of activity, we analyzed the effects of the lack of leptin on the composition and activity of the MOB cellular network.

Université Paris-Saclay

Espace Technologique / Immeuble Discovery

Route de l'Orme aux Merisiers RD 128 / 91190 Saint-Aubin, France



We quantified bulbar adult neurogenesis and found that 21 days after BrdU injections, a cell birth marker, ob/ob mice showed an increased number of both new periglomerular and granular cells as compared to control, suggesting that leptin regulates new neuron elimination. We also tested whether an inflammation could be occurring in the MOB. Using RTPCR of different neuronal and glial markers we did not observe strong signs of inflammation.

Then we probed changes in local network activity in the deep layers of the MOB by recording local field potentials during a Go/NoGo odor discrimination task. We observed that the power of beta oscillations, the functional marker of the olfactory network between the MOB and the olfactory cortex, is way higher in the MOB of ob/ob mice compared to control mice.

Taken all together these results suggest that there is a strong modulation of spontaneous and food odor-activity of the MOB in the obese mice in the absence of leptin. The injection of this hormone strongly activates the deep layers of the MOB. This area of the MOB is also characterized by strong oscillations of the LFP and we have shown that during the learning of an olfactory discrimination task the beta oscillation related to MOB-olfactory cortex network is upregulated in obese mice. We conclude that regulation of the centrifugal fibers could be a major role of leptin in the MOB network and the source of profound changes in activity in obese mice.

